



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE POS-GRADUACAO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO POR LC-
MS/MS PARA QUANTIFICAÇÃO DAS POLIMIXINAS B E COLISTINA
(POLIMIXINA E) NO MEDICAMENTO INJETÁVEL POLIMIXINA B
ADICIONADO AO MEIO DE CULTURA E ESTUDO PRELIMINAR DA
FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA DA POLIMIXINA B ATRAVÉS
DE MODELO ESTÁTICO DE *TIME KILL CURVES***

THAYSE MARIA DA SILVA

RECIFE, AGOSTO/2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE POS-GRADUACAO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO POR LC-
MS/MS PARA QUANTIFICAÇÃO DAS POLIMIXINAS B E COLISTINA
(POLIMIXINA E) NO MEDICAMENTO INJETÁVEL POLIMIXINA B
ADICIONADO AO MEIO DE CULTURA E ESTUDO PRELIMINAR DA
FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA DA POLIMIXINA B ATRAVÉS
DE MODELO ESTÁTICO DE *TIME KILL CURVES***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração: Produção e Controle de Medicamentos.

THAYSE MARIA DA SILVA

Orientador: Prof. Dr. Davi Pereira de Santana

Co-Orientador: Prof. Dr. Whocely Victor de Castro

Recife - PE, 2013.

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

- S586d Silva, Thayse Maria da.
Desenvolvimento e validação de método bioanalítico por LC-MS/MS para quantificação das polimixinas B e colistina (polimixina E) no medicamento injetável polimixina B adicionado ao meio de cultura e estudo preliminar da farmacocinética e farmacodinâmica da polimixina B através de modelo estático de *time kill curves* / Thayse Maria da Silva. – Recife: O autor, 2015.
104 f. il.; tab.; 30 cm.
- Orientador: Davi Pereira de Santana.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2015.
Inclui referências.
1. Polimixinas. 2. Farmacocinética. 3. Colistina. I. Santana, Davi Pereira de (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2015-103)

Thayse Maria da Silva

Dissertação a ser apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 28/08/2013

BANCA EXAMINADORA

PRIMEIRO EXAMINADOR

Prof. Dr. Whocely Victor de Castro

Universidade Federal de São João Del Rei

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR

Prof. Dra. Juliana Teixeira de Magalhães

Universidade Federal de São João Del Rei

Assinatura: _____

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO

Prof. Dr. Davi Pereira de Santana

Departamento de Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antonio Rodolfo de Faria

VICE – CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Dalci José Brondanni

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite

Dedico esse trabalho aos meus queridos pais Francisco e Rosenilda e ao meu companheiro de todos os momentos Marccone, pelo constante incentivo e apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por sempre caminhar ao meu lado, guiando-me nas decisões a serem tomadas.

Aos meus pais, que me ensinaram o valor que devemos dar a tudo que vivemos e por sempre acreditarem em mim, encorajando sempre, chorando e sorrindo juntos comigo. Amo vocês!

Ao meu marido, Marccone, grande amigo e companheiro, por tudo que passamos de alegrias e de momentos tristes que serviram para amadurecimento. Obrigado por compreender os momentos de ausência durante a execução deste trabalho e por sempre estar pacientemente me incentivando nesta nova etapa em minha vida. Agradeço carinhosamente por cuidar de mim com muita dedicação, amor e carinho.

Ao meu orientador prof. Davi Santana, pela acolhida em seu núcleo (NUDFAC) e por acreditar no meu trabalho.

A Danilo Bedor, gerente analítico do NUDFAC, pela troca de experiências durante o período que estive como colaboradora do núcleo.

Aos professores Whocely Victor e Juliana Magalhães pela acolhida em Divinópolis – MG e pela disponibilidade e amizade de sempre. Sem palavras para agradecer o que aprendi com vocês!

À professora Janete Magali e Fátima do Departamento de Antibióticos - UFPE pela primordial ajuda no início do trabalho.

À professora Márcia Moraes e Carol Almeida do Laboratório de Resistência Microbiana do ICB-UPE pela ajuda e doação da cepa para a realização do trabalho.

À Leuridan Torres e colaboradores do Laboratório de Pesquisa Translacional – IMIP pela doação de meios de cultura, além do carinho e atenção.

À professora Miracy, Ana Regis e Rosário, pelo apoio para a elaboração dos experimentos de microbiologia.

À Adélia Araújo do LATOX-ITEP, por permitir o uso das máquinas no desenvolvimento e validação do método bioanalítico.

Aos amigos do NUDFAC e Farmácia Escola que conquistei durante esse trabalho: Eduardo, Marília, Homero, Sardón, Virna, Amanda, Levi, Ellison, Eliane, Cris, Karine.

As amigas de sempre, Magda, Zênia, Januária.

Aos meus amigos Junio Macena e Adriano Cunha, não tenho palavras para agradecer o carinho, respeito e aprendizado.

À professora Jaqueline e todos os alunos do laboratório de microbiologia da UFSJ, principalmente à técnica, Karina. Apreendi muito com todos vocês! As meninas da república em Divinópolis – MG: Maria, Raíssa e Anna Paula. Obrigada por tornar menos tristes os meus dias longe de casa e por me ensinarem em dois meses de convívio, como é maluco conviver com pessoas tão diferentes, todas mulheres e todas de TPM!!!!!!

Ao programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE.

À FACEPE, pela concessão da bolsa.

À todos que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho. Muito obrigada.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.

Fernando Pessoa

RESUMO

A descoberta dos antibióticos propiciou um grande avanço no combate às infecções. Entretanto, o uso indiscriminado e contínuo de antimicrobianos levam ao desenvolvimento de resistência bacteriana a vários desses compostos. As bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* apresentam mecanismos de resistência a diversas classes de antibióticos e são importantes patógenos causadores de infecções nosocomiais, particularmente em pacientes de Unidade de Terapia Intensiva (UTI). As polimixinas são antimicrobianos polipeptídicos, derivados do *Bacillus sp* descoberto na década de 1940. Somente as polimixinas B e E (Colistina) têm sido usadas na prática clínica. Como no momento não há perspectivas de novas drogas surgirem no mercado, tem sido retomado o interesse na polimixina B, antibiótico cujo uso foi suspenso devido relatos de nefrotoxicidade e neurotoxicidade reportados na década de 1960. O conhecimento da farmacocinética (PK) e farmacodinâmica (PD) da polimixina B é extremamente limitado, o qual foi obtido antes de 1970, e apresenta várias limitações metodológicas, portanto os resultados devem ser analisados com parcimônia. O conhecimento da correlação PK-PD da polimixina B é extremamente importante, e estudos que contribuam para esse conhecimento são urgentes a fim de definir o modo de administração associado à maior eficácia e à menor toxicidade, e potencial de resistência. Uma das ferramentas que podem ser utilizadas para o conhecimento dos padrões PK-PD da polimixina B são as *Kill curves* ou curvas de morte. Essa ferramenta consiste na quantificação, em diferentes intervalos de tempo, do número de micro-organismo viáveis em meio de cultura após exposição a diferentes concentrações do antibiótico, obtidas a partir da determinação da concentração inibitória mínima. As informações obtidas a partir das curvas de morte auxiliam na racionalização da terapia hospitalar de modo a aumentar as chances de sucesso terapêutico, bem como, minimizar o risco de surgimento de resistência dos microorganismos aos antibióticos. Entretanto, para se estabelecer uma correlação PK-PD se faz necessário um método analítico que quantifique com precisão e exatidão o fármaco durante os estudos *in vitro*. Desse modo, o objetivo geral do trabalho foi desenvolver e validar um método de quantificação por LC/MS-MS das polimixinas B e colistina (polimixina E) simples, rápido e seguro, capaz de auxiliar os estudos *in vitro* de *Kill curves* visando a complementação de informações para um melhor conhecimento acerca da farmacocinética e farmacodinâmica destes fármacos.

Palavras chave: Polimixinas. Farmacocinética. Colistina

ABSTRACT

The discovery of the antibiotics was a landmark to the effective control of the infections. However, the indiscriminate and continued use of the antimicrobials lead to development of bacterial resistance against several of these compounds. Gram-negative *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* developed mechanisms of resistance to various classes of antibiotics and are important pathogens related to nosocomial infections, particularly in Intensive Care Unit (ICU) patients. The polymyxins are polypeptide antibiotics derived from *Bacillus sp* discovered in the 1940s. Only polymyxin B and E (Colistin) have been used in clinical practice. So far, there are no prospects for new drugs appear in the market, therefore the interest in polymyxin B has emerged. These drugs were suspended for clinical use due to reports of nephrotoxicity and neurotoxicity in the 1960s. The knowledge of the pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) of polymyxin B is extremely limited, which was obtained before 1970, but with several methodological limitations and their results should be analyzed cautiously. The PK-PD data about polymyxin B is extremely important, and studies that contribute to this knowledge are urgently needed in order to define the drug regimen associated with higher efficacy, and lower toxicity and potential for resistance. One of the tools that can be used to determine the PK -PD profile of polymyxin B are the kill curves which comprises in quantifying at different time intervals, the number of viable microorganisms in broth after exposed at different antibiotic concentrations based on its minimum inhibitory concentration. Information obtained from the kill curves are an important to streamline hospital therapy in order to increase the chances of therapeutic success, as well as minimize the risk of emergence of resistance of microorganisms to antibiotics. However, to establish a PK-PD relationship is necessary an analytical method able to quantify the drug precisely and accurately during the in vitro studies. Therefore, this work aimed to develop and validate a simple, fast and secure analytical method to quantify by LC/MS-MS both polymyxin B and colistin (polymyxin E), during the in vitro *kill curves* studies order to complement information for a better understanding regarding the pharmacokinetics and pharmacodynamics of these drugs.

Keywords: Polymyxins. Pharmacokinetics. Colistin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Estrutura química geral das polimixinas.....	28
--	----

CAPÍTULO II– DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO

Figura 2 - Estrutura química geral das polimixinas.....	44
Figura 3 - Cromatograma das frações B1 e B2 de polimixina B obtido a partir de solução a 100ng/mL, em fluxo de 0.2 mL/min e composição de fase móvel: 20% A (água 0.1% ácido fórmico) e 80% B (acetonitrila).....	52
Figura 4 - Cromatograma das frações B1 e B2 de polimixina B e frações A e B de colistina obtido de solução de 500ng/mL, com fluxo de 0.2 mL/min e composição de fase móvel:15% A (água 0.1% ácido fórmico) 85% B (acetonitrila).....	53
Figura 5 - Cromatograma das frações B1 e B2 de polimixina B e frações A e B de colistina obtido de solução de 1000ng/mL obtido com fluxo de 0.2 mL/min e composição de fase móvel: 17% A (água 0.1% ácido fórmico) 83% B (acetonitrila) e forno a 80°C.....	54
Figura 6 – Cromatograma da extração do LSQ (10500ng/mL) das frações constituintes B1 e B2 da polimixina B e PI.....	57
Figura 7 - Cromatograma da extração do CQB (200ng/mL) das frações constituintes A e B da colistina (polimixina E) e PI.....	58
Figura 8 – Curva de calibração da polimixina B	67
Figura 9 – Curva de Calibração da colistina (polimixina E).....	67

CAPÍTULO III – ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

Figura 10 – Índices farmacocinéticos/ farmacodinâmicos empregados na avaliação da eficácia dos antimicrobianos.....	82
Figura 11 – Esquema do experimento para determinação da CIM.....	85
Figura 12 – Determinação da fase Log.....	88
Figura 13 – Resultado do experimento de <i>Time kill curves</i> estáticas.....	88

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 – Dosagem de Colistimetato de sódio e polimixina B.....	31
Tabela 2 – Dose renal de polimixina B IV.....	32

CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO

Tabela 3 – Componentes da polimixina B e Colistina (polimixina E).....	45
Tabela 4 – Gradiente da cromatografia, onde: % A (água + TFA 0,05%) e %B (acetonitrila).....	49
Tabela 5 – Informações gerais do método.....	50
Tabela 6 – Composição de fase móvel.....	55
Tabela 7 – Condições de cromatografia.....	56
Tabela 8 – Proporção das frações constituintes da polimixina B.....	59
Tabela 9 – Proporção das frações constituintes da colistina (polimixina E).....	59
Tabela 10 – Resultados da seletividade para a polimixina B	59
Tabela 11 – Resultados da seletividade para a Colistina (polimixina E)	60
Tabela 12 - Recuperação, no nível de CQB, da polimixina B (considerando as duas frações constituintes).....	60
Tabela 13 – Recuperação, no nível de CQA, da polimixina B (considerando as duas frações constituintes).....	61
Tabela 14 – Recuperação da polimixina B (considerando a soma das duas frações constituintes).....	61
Tabela 15 – Recuperação, no nível de CQB, da Colistina (polimixina E) (considerando as duas frações constituintes).....	62
Tabela 16 – Recuperação, no nível de CQA, da Colistina (polimixina E) (considerando as duas frações constituintes).....	62
Tabela 17 – Recuperação da Colistina (polimixina E) (considerando a soma das duas frações constituintes).....	63
Tabela 18 – Recuperação do PI.....	63
Tabela 19 – Precisão e exatidão da polimixina B.....	64
Tabela 20 – Precisão e exatidão da Colistina (polimixina E).....	64

Tabela 21 – Linearidade da Polimixina B.....	65
Tabela 22 – Linearidade da Colistina (polimixina E).....	66
Tabela 23 – Média dos coeficientes angular, linear e de correlação das curvas de calibração da polimixina B e Colistina (polimixina E).....	66
Tabela 24 – Percentual de degradação da polimixina B (considerando a soma das frações constituintes) nas soluções estoque para preparo de padrões de calibração e controles de qualidade após 5 e 8 dias de armazenamento das soluções estoque em geladeira (2 a 8°C).....	68
Tabela 25 – Percentual de degradação da colistina (polimixina E) (considerando a soma das frações constituintes) nas soluções estoque para preparo de padrões de calibração e controles de qualidade após 5 e 8 dias de armazenamento das soluções estoque em geladeira (2 a 8°C).....	68
Tabela 26 – Percentual de degradação do padrão interno (leucina encefalina) após 5 e 8 dias de armazenamento das soluções estoque em geladeira 2 a 8°C).....	69
Tabela 27 Percentual de degradação de polimixina B nas soluções estoque para realização dos experimentos de microbiologia após 5 e 8 dias de armazenamento das soluções estoque em geladeira (2 a 8°C) e freezer (-20°C).....	70
Tabela 28 – Proporção das frações B1 e B2 da polimixina B nas soluções estoque para preparo de curvas e controles após 5 dias de armazenamento das soluções estoque em geladeira (2 a 8°C).....	71
Tabela 29 – Proporção das frações B1 e B2 da polimixina B nas soluções estoque para preparo de curvas e controles após 8 dias de armazenamento das soluções estoque em geladeira (2 a 8°C).....	71
Tabela 30 – Proporção das frações A e B da colistina (polimixina E) nas soluções estoque para preparo de curvas e controles após 5 dias de armazenamento das soluções estoque em geladeira (2 a 8°C).....	72
Tabela 31 – Proporção das frações A e B da colistina (polimixina E) nas soluções estoque para preparo de curvas e controles após 8 dias de armazenamento das soluções estoque em geladeira (2 a 8°C).....	72
Tabela 32 – Percentual de degradação da polimixina B (B1+B2) após 24h de armazenamento das amostras extraídas a 25°C no auto-injetor.....	73
Tabela 33 – Percentual de degradação da Colistina (polimixina E) (A + B) após 24h de armazenamento das amostras extraídas a 25°C no auto injetor.....	74

Tabela 34 – Proporção das frações constituintes da polimixina B e polimixina E encontradas no medicamento.....	75
---	----

CAPÍTULO III – ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

Tabela 35 – Dosagem de polimixina B e Colistimetato de sódio.....	80
--	----

Tabela 36 - Percentagem de morte de bactérias frente à polimixina B.....	87
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AUC – área sob a curva

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLAE - Cromatografia Líquida de alta eficiência

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

C_{max}: Concentração máxima

CMS – Colistimetato sódico

CQB – Controle de Qualidade Baixo

CQM – Controle de Qualidade Médio

CQA – Controle de Qualidade Alto

CV – coeficiente de variação

CZE - eletroforese capilar de zona

Dab - 5 L- α , ácido γ -diaminobutírico

DBSA – Ácido dodecil benzeno sulfônico

DP – Desvio Padrão

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

ESI – Eletrospray

HEMOPE – Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco

KILL CURVES – curvas de morte

IV – intravenoso

IM - intramuscular

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas em *tandem*

LIQ – Limite Inferior de Quantificação

LPS - lipopolissacarídeo

LSQ – Limite Superior de Quantificação

MDR – multidroga resistente

MRM – monitoramento de reações múltiplas

PI – Padrão Interno

PK /PD – farmacocinética farmacodinâmica

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RPM – Rotações por minuto

SPE – Extração em fase sólida

TFA – Ácido trifluoroacético

USP – United States Pharmacopeia

LISTA DE SÍMBOLOS

µg – micrograma

µL – microlitro

mL - mililitro

mg – miligrama

mm – milímetro

min - minuto

% - porcentagem

°C – graus Celsius

V – volt

kV – quilovolt

ms - milisegundos

L/hr – litro por hora

UFC/mL - Unidades Formadoras de Colônia por mililitro

SUMÁRIO

1 Introdução.....	18
1.1 Referências	21
2 Objetivos.....	24
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3 Capítulo I. Revisão Bibliográfica.....	26
3.1 Histórico.....	27
3.2 Estrutura química.....	27
3.3 Preparações comerciais.....	28
3.4 Mecanismo de ação.....	28
3.5 Espectro de ação.....	29
3.6 O problema da multirresistência.....	29
3.7 Dosagem.....	30
3.8 Farmacocinética.....	32
3.9 Farmacodinâmica.....	33
3.10 Toxicidade.....	34
3.11 Resistência.....	35
3.12 Estudos clínicos.....	35
3.12.1 Estudos clínicos com colistina.....	35
3.12.2 Estudos clínicos com polimixina B.....	36
3.13 Referências.....	37
4 Capítulo II. Desenvolvimento e validação de método bioanalítico.....	43
4.1 Introdução.....	44
4.2 Materiais e métodos.....	47
4.2.1 Reagentes e padrões.....	47
4.2.2 Plasma	47
4.2.3 Soluções estoque e soluções de trabalho.....	48
4.2.4 LC-MS/MS.....	48
4.2.5 Proporção das frações constituintes das polimixinas.....	49
4.2.6 Parâmetros de validação.....	51
4.3 Resultados e discussão.....	52
4.3.1 Desenvolvimento do método bioanalítico.....	52

4.3.2 Validação de método bioanalítico.....	58
4.3.2.1 Determinação da proporção das frações constituintes da polimixina B e colistina (polimixina E).....	58
4.3.2.2 Seletividade.....	59
4.3.2.3 Recuperação.....	60
4.3.2.4 Precisão e exatidão.....	63
4.3.2.5 Linearidade.....	65
4.3.2.6 Estabilidade de solução estoque para preparo de padrões de calibração e controles de qualidade.....	67
4.3.2.7 Estabilidade de solução estoque de polimixina B para a realização dos experimentos de microbiologia.....	69
4.3.2.8 Estabilidade pós-processo.....	72
4.3.2.9 Proporção das frações constituintes da polimixina B e Colistina (polimixina E) no medicamento Sulfato de polimixina B 500.000UI, Eurofarma, adicionado ao meio de cultura.....	74
4.4 Conclusão.....	75
4.5 Referências bibliográficas.....	75
5 Capítulo II. Ensaio microbiológicos.....	78
5.1 Introdução.....	79
5.2 Materiais e métodos.....	84
5.2.1 Micro-organismo.....	84
5.2.2 Antibiótico.....	84
5.2.3 Preparo das soluções.....	84
5.2.4 Determinação da CIM.....	85
5.2.5 Determinação do tempo da fase Log de crescimento microbiano.....	86
5.2.6 <i>Time Kill curves</i> estáticas.....	86
5.3 Resultados e discussão.....	87

5.3.1 Determinação da CIM.....	87
5.3.2 Determinação do tempo da fase Log de crescimento microbiano.....	87
5.3.3 <i>Time Kill curves</i> estáticas.....	88
Conclusão.....	94
Referências.....	96

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A maioria dos antibióticos disponíveis atualmente é derivada de estruturas básicas introduzidas entre meados da década de 1930 e final da década de 1960. Segundo os cientistas, as novas gerações de antibióticos são, em sua grande maioria, resultadas de modificações químicas periféricas desses arcabouços antigos. Por exemplo, a amoxicilina é uma simples modificação da penicilina (MORALES *et al* 2010). Como no momento não há perspectivas de novas drogas surgirem no mercado, tem sido retomado o interesse nos “velhos” antibióticos, como é o caso da polimixina B, que teve seu uso suspenso devido relatos de nefrotoxicidade e neurotoxicidade reportados na década de 1960 (MARKOU *et al*, 2003). Associado a esse fato ressalta-se os constantes casos clínicos de pacientes com infecções causadas por micro-organismos multirresistentes (GRÉGOIRE, *et al* 2008; LI *et al* 2006; MICHALOPOULOS *et al* 2005; MICHALOPOULOS *et al* 2008; PLACHOURAS *et al* 2009).

Dentre os principais mecanismos de ação dos antimicrobianos podemos citar: efeitos sobre a síntese da parede celular, que é o mecanismo dos beta-lactâmicos, carbapenêmicos e glicopeptídeos, inibição da síntese protéica, que é o caso dos aminoglicosídeos e macrolídeos, inibidores do ácido fólico, como as sulfonamidas ou que causam interferência na síntese do ácido nucleico como é o caso das quinolonas, além de efeitos sobre a estrutura e função da membrana celular, como as polimixinas (ROSSI e ANDREAZZI, 2005). As bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* apresentam mecanismos de resistência a várias classes de antibióticos e são importantes patógenos causadores de infecções nosocomiais, particularmente em pacientes de Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (HELFAND *et al*, 2005; MCGOWAN, *et al*, 2006; RAMPHAL, *et al* 2006; ROSSOLINI, *et al* 2005).

As polimixinas são antimicrobianos polipeptídicos, derivados do *Bacillus sp* descoberto na década de 1940. Somente as polimixinas B e E (Colistina) têm sido usadas na prática clínica, sendo a colistina com mais relatos clínicos. (LI *et al*, 2005; LI *et al*, 2006; OWEN *et al*, 2007). O espectro de atividade que possuem é quase idêntico (GALES *et al*, 2001), apresentando atividade contra vários bacilos Gram-negativos aeróbios (KVITKO, 2010) e quase nenhuma atividade contra bactérias Gram-positivas e anaeróbias (EVANS *et al*, 1999; HERMSEN *et al*, 2003). As enterobactérias,

Escherichia coli, *Enterobacter spp*, *Salmonella spp*, *Shigella spp* e *Klebsiella spp* costumam ser sensíveis.

Como as polimixinas são antibióticos antigos, que não foram submetidos a estudos randomizados para serem aprovados (ZAVASCKI *et al*, 2007; LI *et al*, 2006), a maioria das experiências clínicas vêm de série de casos, principalmente do uso da polimixina B em infecções por bacilos Gram-negativos multirresistentes (OUDERKIK *et al*, 2003; SOBIESZCZYK *et al*, 2004; HOLLOWAY *et al*, 2006; PEREIRA *et al*, 2007; FURTADO *et al*, 2007; ZAVASCKI *et al*, 2010). Estes apresentam uma série de limitações, como ausência de um grupo controle e administração concomitantemente, dificultando assim, conclusões (KVITKO, 2010).

Outro fator importante a ser considerado é a limitação do conhecimento da farmacocinética (PK) e farmacodinâmica (PD) da polimixina B, cujo resultado obtido antes de 1970, mas apresenta várias limitações metodológicas e por isso, precisam ser analisados com cautela (EVANS *et al*, 1999; LI *et al*, 2005; ZAVASCKI *et al*, 2007; TAM *et al*, 2005). O conhecimento dos padrões PK-PD da polimixina B é extremamente importante, portanto, estudos que contribuam para esse conhecimento são urgentes, já que com estes pode-se definir o modo de administração associado à maior eficácia e à menor toxicidade, bem como o potencial de resistência (ZAVASCKI *et al*, 2007).

Um fator contribuinte para desacelerar a geração de estudos PK-PD referentes a esses fármacos é a dificuldade analítica para sua quantificação correta em matriz biológica. A extrema complexidade da matriz amostra e a presença de compostos interferentes são alguns dos fatores que explicam a dificuldade e o emprego de técnicas analíticas mais sensíveis. Assim, procedimentos para o preparo das amostras de forma mais específica se faz necessário.

Esta dissertação está dividida em três capítulos.

O primeiro capítulo é constituído de uma revisão bibliográfica sobre as polimixinas abordando pontos importantes para a compreensão sobre o fármaco como estrutura química, dosagem, farmacocinética, farmacodinâmica, toxicidade, entre outros, além de apresentar alguns estudos clínicos já realizados com as polimixinas.

O segundo capítulo, é constituído de uma pequena revisão de literatura, voltada para métodos analíticos já desenvolvidos e validados para quantificação das polimixinas

em diferentes matrizes biológicas. Este capítulo propõe um novo método simples e rápido para quantificação das frações constituintes das polimixina B e colistina (polimixina E) no medicamento injetável de Polimixina B adicionado ao meio de cultura.

No capítulo 3 é feita uma abordagem sobre parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos que podem ser considerados para um ajuste de dose. Este capítulo apresenta alguns ensaios realizados com a finalidade da elaboração de *kill curve* estática para uma abordagem preliminar acerca da relação efeito-concentração do fármaco para adaptação da dosagem e minimização de abordagens através da tentativa e erro que ocorrem nos hospitais e que levam à propagação da resistência dos micro-organismos.

1.1 REFERÊNCIAS

CARLOS HENRIQUE CEZIMBRA KVITKO. Dissertação: Eficácia da polimixina B no tratamento de bacteremias por *Pseudomonas aeruginosa*. 2010. 80 pág. Ciências Médicas. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, BR- RS.

EVANS, M.E.; FEOLA, D.J.; RAPP, R.P. Polymyxin B sulfate and colistina: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. **Annals of pharmacotherapy**. 1999;33: 960-7.

FURTADO, G.M.; D'AZEVEDO, P.A.; GALES, A.C.; PIGNATARI, A.C.; MEDEIROS, E.A. Intravenous polymyxin B for the treatment of nosocomial pneumonia caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal Antimicrobials Agents**. 2007; 30: 315-9.

GALES, A.C; REIS, A.O.; JONES R.N. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. **Journal Clinical Microbiology** 2001; 39(1):183–90.

GRÉGORIE, N.; GOBIN, P.; GRIGNON, C.; FRASCA, D.; SAULNIER, P.; COUET, W.; MIMOZ, O. Pharmacokinetic modelling of colistin methanesulfonate (CMS) and colistin in healthy volunteers after intravenous infusion. Annual Interscience Conference on **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**[ICAAC], 2008.

HELFAND, M.S.; BONONO, R.A. Current challenges in antimicrobial chemotherapy: the impact of extended-spectrum beta-lactamases and metallo-beta-lactamases on the treatment of resistant Gram-negative pathogens. **Current Opinion Pharmacology**. 2005; 5:452-8.

HOLLOWAY, K.P.; ROUPHAEL, N.G.; WELLS, J.B.; KING, M.D.; BLUMBERG, H.M. Polymyxin B and doxycycline use in patients with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in the intensive care unit. **Annals of pharmacotherapy**. 2006; 40: 1939-45.

LI, J.; NATION, R.L.; MILNE, R.W.; TURNIDGE, J.D.; COUTHARD, K. Evaluation of colistin as an agent against multiresistant Gram-negative bacteria. **International Journal Antimicrobials Agents** . 2005; 25: 11-25.

LI, J.; NATION, R.L.; TURNIDGE, J.D.; MILNE, R.W.; COUTHARD, K.; RAYNE, C.R.; PATERSON, D.L. Colistin; the re-emerging antibiotic for multidrug resistant Gram-negative bacterial infections. **Lancet Infectious Diseases**. 2006; 6: 589-601.

LI, J.; RAYNER, C.R.; NATION, R.L.; OWEN, R.J.; SPELMAN, D.; TAM, K.E.; LIOLIOS, L. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents Chemother**. 2006; 50: 2946-50.

MARKOU, N.; APOSTOLAKOS, H.; KOUMOUDIOLU, C.; ATHANASIOU, M.; KOUTSOUKOU, A.; ALAMANOS, I.; GREGORAKOS, L.; Intravenous colistin in the treatment of sepsis from multiresistant Gram-negative bacilli in critically ill patients. **Critical Care**. 2003; 7: R78-83.

MCGOWAN, J.E. Resistance in nonfermenting Gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. **Antimicrobial Journal Infectious Control**. 2006; 34: S29-37.

MICHALOPOULOS, A.; KASIAKOU, S. K.; MASTORA, Z.; RELLOS, K.; KAPASKELIS A. M.; FALAGAS, M. E. Aerosolized colistin for the treatment of nosocomial pneumonia due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis. **Critical Care** 2005; 9:R53–R59.

MICHALOPOULOS, A.; FOTAKIS, D.; VIRTZILI, S.; VLETSAS, C.; RAFTOPOULOU, S.; MASTORA, Z.; FALAGAS, M. E. Aerosolized colistin as adjunctive treatment of ventilator-associated pneumonia due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria: a prospective study. **Respiratory. Medicine** 2008; 102:407–412.

MORALES, A.P.; CALDAS, C. De volta à era pré – analítica: a busca emergencial por novos arcabouços. **Ciência e Cultura** [online] 2010; 62 (6): 14-16

OUDEKIRK, J.P.; NORD, J.A.; TURETT, G.S.; KISLAK, J.W. Polymyxin B nephrotoxicity and efficacy against nosocomial infectious caused Gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents Chemother**. 2003; 47: 2659-62.

OWEN, R.J.; LI, J.; NATION, R.L.; SPELMAN, D. In vitro pharmacodynamics of colistin against multiresistant Gram-negative bacteria. **Journal Antimicrobials Chemother**. 2007; 59: 473-7.

PEREIRA, G.M.; MULLER, P.R.; LEVIN, A.S. Salvage treatment of pneumonia and initial treatment of tracheobronchitis caused by multidrug-resistant Gram-negative

bacilli with inhaled Polymyxin B. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 2007; 58, 235-40.

PLACHOURAS, D.; KARVANEN, M.; FRIBERG, L. E.; PAPADOMICHELAKIS, E.; ANTONIADOU, A.; TSANGARIS, I.; KARAIKOS, I.; POULAKOU, G.; KONTOPIDOU, F.; ARMAGANIDIS, A.; CARS, O.; GIAMARELLOU, H.. Population pharmacokinetic analysis of colistin methanesulfonate and colistin after intravenous administration in critically ill patients with infections caused by Gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents Chemother** 2009; 53:3430–3436.

RAMPHAL, R.; AMBROSE, P.G. Extended-spectrum beta-lactamases and clinical outcomes: current data. **Clinical Infectious Diseases**. 2006; 42: S164-72.

ROSSI, Flávia; ANDREAZZI, Denise B. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma. São Paulo – SP. Editora Atheneu, 2005.

ROSSOLINI, G.M.; MANTEGOLI, E. Treatment and control of severe infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Microbiology Infectious**. 2005; 11: 17-32.

SOBIESZCZYK, M.E.; FURUYA, E.Y.; HAY, C.M.; PANCHOLI, P.; DELLALATTA, P.; HAMMER, S.M.; KUBIN, C.J. combination therapy with Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant Gram-negative respiratory tract infections. **Journal Antimicrobials Chemother**. 2004; 54: 566 – 9.

TAM, V.H.; SCHILLING, A.N.; VO, G.; KABBARA, S.; KWA, A.L.; WIEDEHOLD, N.P.; LEWIS, R.E. Pharmacodynamics of Polymyxin B against *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemother**. 2005; 49: 3614-30.

ZAVASCKI, A.P.; GOLDANI, L.Z.; NATION, R.L. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. **Journal Antimicrobials Chemother**. 2007; 60: 1206 – 15.

ZAVASCKI, A.P.; CARVALHAES, C.G.; PICÃO, R.C.; GALES, A.C. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. **Expert Review Antimicrobial Infections Therapy**. 2010; 8: 71-93.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método bioanalítico por LC-MS/MS para quantificação das polimixinas B e Colistina (Polimixina E) no medicamento injetável Polimixina B adicionado ao meio de cultura e uso de modelo estático de *Time Kill Curves* para estudo preliminar da farmacocinética e farmacodinâmica da polimixina B.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolvimento e validação do método bioanalítico para quantificação das Polimixinas B e Colistina (Polimixina E) no medicamento Polimixina B injetável adicionado ao meio de cultura;
- Determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) e tempo necessário para alcance da fase Log de crescimento microbiano da cepa padrão Gram negativa, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, segundo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) frente à Polimixina B;
- Determinação *in vitro* do número de bactérias viáveis em função do tempo após a exposição a diferentes concentrações de antibiótico (*Time Kill Curves*) incluindo aquelas acima e abaixo da CIM (Concentração Inibitória Mínima).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HISTÓRICO

As polimixinas foram descobertas em 1947 e embora existam cinco moléculas conhecidas de polimixina, sequencialmente nomeadas de A a E, apenas duas estão disponíveis para uso terapêutico: polimixina B e polimixina E (colistina). A polimixina B foi inicialmente isolada do *Bacillus polymyxa* e a colistina do *Bacillus colistinus*. Há duas preparações de colistina: sulfato de colistina e colistimetato sódico. A polimixina B é utilizada na forma de sulfato de polimixina. O colistimetato sódico é inativo até que ocorra sua hidrólise, a qual ocorre tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Notavelmente, colistimetato sódico é a polimixina menos ativa *in vitro* (quatro a oito vezes menos ativo) (HERMSEN *et al*, 2003), mas é também o composto menos nefrotóxico em comparação com polimixina B e sulfato de colistina (LI *et al*, 2005; KWA *et al*, 2007).

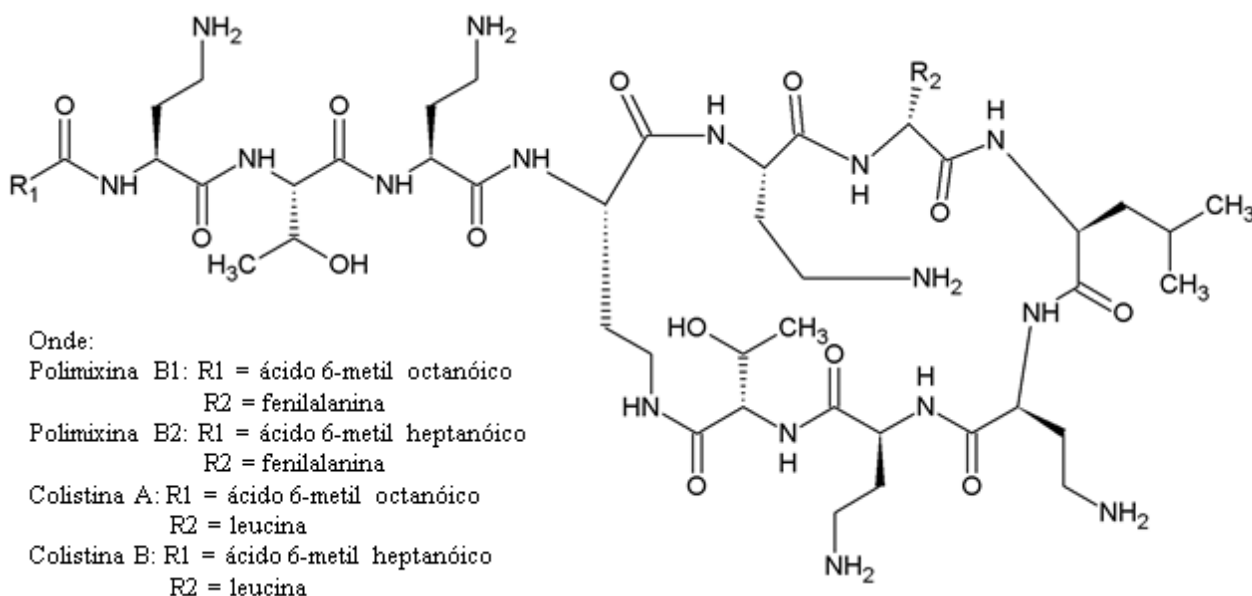
As polimixinas foram usadas para tratar infecções graves causadas por bacilos Gram-negativos na década de 1960, mas caiu em desuso em 1980 por causa de sua nefrotoxicidade e, posteriormente, tornaram-se principalmente reservadas à administração tópica e oral (FALAGAS *et al*, 2006; ZAVASCKI *et al*, 2007). O recente surgimento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, e outros bacilos Gram-negativos multirresistentes a praticamente todos os agentes antimicrobianos resultou na retomada da utilização da polimixina injetável (MICHALOPOULOS *et al*, 2010; TAM *et al*, 2010).

3.2 ESTRUTURA QUÍMICA

A estrutura química das polimixinas B e colistina (polimixina E) é composta por um anel peptídico policatiônico, contendo 10 aminoácidos com elevada porcentagem de resíduos de 5 L- α , ácido γ -diaminobutírico (Dab) e uma cadeia de ácido graxo aderida ao anel peptídeo, através de uma ligação amida. O anel se completa através dos grupos α -amino e carboxil do resíduo do Dab na posição 4. O ácido graxo normalmente é o ácido 6-metil octanóico ou 6-metil heptanóico. (ZAVASCKI *et al*, 2007; KANG, *et al*, 2000). Existe apenas uma diferença de aminoácidos entre colistina (polimixina E) e polimixina B (LI *et al*, 2006) e ambas são polications no pH fisiológico devido aos resíduos de 5 L- α , ácido γ -diaminobutírico (Dab). As polimixinas são anfipáticas, com hidrofobicidade principalmente atribuíveis à porção acilo e hidrofiliabilidade devido ao 5 L- α , ácido γ -diaminobutírico (Dab) grupos. Assim, polimixinas são capazes de se ligarem a s diferentes superfícies. A colistina (polimixina E) apresenta dois componentes principais denominados E1 (colistina A) e E2 (colistina B), ao passo que

na polimixina B, os componentes principais são denominados B1 e B2 (DECOLIN *et al* 1997).

Figura 1: Estrutura química geral das polimixinas.



3.3 PREPARAÇÕES COMERCIAIS

A polimixina B é encontrada comercialmente na forma sulfato e utilizada topicamente (pele, ouvidos e olhos) e por via parenteral (intravenosa, intramuscular e intratecal). A polimixina E (colistina) é encontrada como sulfato, usada topicamente para descontaminação intestinal, e como colistimetato de sódio para uso parenteral (intravenoso, intramuscular, intratecal) e inalatório (GALES *et al* 2001).

3.4 MECANISMO DE AÇÃO

Por serem antibióticos anfipáticos, e atuam primariamente nas membranas externa e citoplasmática, com ação semelhante a detergentes catiônicos simples. Ligam-se a componentes do envelope celular como fosfolípidos e lipopolissacarídeos (LPS), deslocando competitivamente os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} que agem como estabilizadores da membrana, provocando ruptura da mesma, levando à perda do conteúdo celular e ocasionando morte da bactéria. Essa ação parece ser inibida na presença desses cátions divalentes. O fato de serem capazes de se ligar e inativar os lipopolissacarídeos (LPS),

estrutura relacionada com o desencadeamento da sepse e choque séptico têm suscitado estudos com o objetivo de avaliar o uso das polimixinas no tratamento destas síndromes, inibindo ou reduzindo o estímulo inflamatório induzido pelo LPS. Neste sentido, aparatos para remoção de LPS e mediadores inflamatórios, como filtros de diálise impregnados de polimixina B, têm sido utilizados com algum sucesso (MENDES E BURDMANN, 2009).

3.5 ESPECTRO DE AÇÃO

O espectro antimicrobiano abrange somente bacilos Gram-negativos. Estudos de de vigilância epidemiológica (MENDES E BURDMANN, 2009) demonstraram excelente atividade da polimixina B contra *Pseudomonas aeruginosa* (1,3% de resistência) e *Acinetobacter spp* (2,1% de resistência), com CIM50 $\leq$ 1 mg/L e CIM90 $\leq$ 2mg/L para ambos os patógenos, e para *Citrobacter spp.*, *Escherichia coli* e *Klebsiella spp* (CIM90, $\leq$ 1 mg/L; < de 2% de resistência). A sensibilidade foi mais variável para *Enterobacter spp* (83,3% de susceptibilidade; CIM50, $\leq$ 1 mg/L) e *Stenotrophomonas maltophilia* (72,4% de susceptibilidade; CIM50 $\leq$ 1 mg/L). A sensibilidade é mais limitada (CIM50 > 8mg/L) para *Burkholderia cepacia* (11,8% de susceptibilidade), *Serratia spp.* (5,4% de susceptibilidade), *Proteus spp* indol-positivo. (1,3% de susceptibilidade) e *Proteus mirabilis* (0,7% de susceptibilidade). As polimixinas não são ativas contra bactérias Gram-positivas e fungos. A atividade bactericida desta classe de antibióticos manteve-se praticamente inalterada desde a sua introdução, apesar de já ter sido observada alguma resistência, e existirem relatos de associação de antibióticos para potencializar o seu efeito bactericida (MENDES E BURDMANN, 2009). O espectro de atividade das polimixinas B e colistina (polimixina E) é quase idêntico (GALES *et al* 2001).

3.6 O PROBLEMA DA MULTIRRESISTÊNCIA EM BACILOS GRAM-NEGATIVOS

A resistência a antimicrobianos tem aumentado drasticamente nos últimos anos (JONES *et al*, 1996). A escolha da terapêutica empírica é extremamente importante, pois uma evolução clínica desfavorável poderá ocorrer se a terapêutica antimicrobiana adequada for retardada (ELIAS, 2010). A prevalência de resistência de patógenos em unidades de terapia intensiva é alta, 21% na maioria dos hospitais (ITOKAZU *et al* 1996) e está associada a altas taxas de mortalidade. Por exemplo, as taxas de

mortalidade de infecções pelo *Acinetobacter baumannii* têm sido reportadas em torno de 52% para bacteremias e 23 a 73% para pneumonias (JAIN *et al*, 2004).

Pseudomonas aeruginosa, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*, estão entre as bactérias que possuem mecanismos múltiplos de resistência a várias classes de antibióticos (HANLON, 2005; HELFAND *et al*, 2005; MCGOWAN, 2006; RAMPHAL, *et al*, 2006; ROSSOLINI *et al*, 2005). São importantes patógenos nosocomiais afetando pacientes imunocompetentes e imunossuprimidos e são responsáveis por grande parte das infecções em unidades de terapia intensiva no mundo (FALAGAS *et al* 2007).

Além disso, uma vez introduzido no ambiente hospitalar, sua erradicação se torna difícil, e a disseminação tanto intra quanto inter-hospitalar pode ocorrer de maneira rápida e ampla (SADER *et al*, 1996).

3.7 DOSAGEM

As doses de polimixina B e colistimetato de sódio utilizados na prática clínica estão demonstrados na tabela 1. Vale ressaltar, entretanto, que essas doses foram definidas a partir da experiência empírica no uso dessas drogas, não tendo nenhum embasamento em estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos mais recentes (LI *et al*, 2006). O mesmo se pode dizer para as recomendações de ajustes de doses na perda da função renal (tabela 2) ou nas diversas modalidades de hemodiálise (ZAVASCKI *et al*, 2008; PLACHOURAS, *et al* 2009).

Tabela 1: Dosagem de Colistimetato de sódio e polimixina B

Colistimetato de sódio	Polimixina B
Para pacientes com $\leq 60\text{kg}$ e função renal normal:	Para adultos e crianças maiores de 2 anos e com função renal normal:
IV ou IM: 4 a 5 mg/kg/dia dividida em 3 doses	IV: 15.000 – 25.000 U/kg/dia divididas em 2 doses
Para pacientes com $> 60\text{kg}$ e função renal normal:	IM: 25.000 – 30.000 U/kg/dia divididas em 4 a 6 doses
IV ou IM: 240 a 480 mg/dia até 720 mg/dia dividida em 3 doses	Intratecal: 50.000 U diária por 3 a 4 dias, depois 50.000 U em dias alternados 1 vez ao dia por pelo menos 14 dias, após culturas do líquido negativas e/ou glicose normal.
Inalação:	
40mg (500.000 U) 12/12 horas se $\leq 40\text{kg}$	
80mg (1.000.000U) 12/12 horas se $> 40\text{kg}$	
Para infecções pulmonares recorrentes, a dose aerossol pode ser aumentada para 160mg (2 milhões U) a cada 8 horas.	
Intratecal/ intraventricular: 10mg	
Adaptado de ELIAS 2010	

Tabela 2: Dose renal de polimixina B IV

Clearence da creatinina total (CCT)	Dose
20 – 50 mL/min	75 – 100% da dose total diária de 2,5mg/kg (25.000 U/kg)
5 – 20 mL/min	50% da dose total diária de 2,5mg/kg (25.000 U/kg)
< 5 mL/min	15% da dose total diária de 2,5mg/kg (25.000 U/kg)

Adaptado de ELIAS 2010

3.8 FARMACOCINÉTICA

Estudos referentes à farmacocinética da polimixina B são necessários para conhecimento e otimização do uso, pois os relatos publicados a mais de 30 anos referem-se à administração intramuscular. A recomendação atual intravenosa da polimixina B ao paciente com função renal normal é de 1,5-2,5 mg/kg/dia dividida em duas doses, administradas em 1 hora de infusão (BEDFORD 2004). Administração intravenosa por infusão contínua tem sido recomendada (EVANS *et al* 1999). Tem sido sugerido para pacientes com disfunção renal, doses ajustadas que incluem decréscimo de dose diária e administração de intervalos prolongados (PULASKI *et al* 1949).

Estudos mais antigos, com metodologia não conhecida, indicam que uma dose de 50mg intramuscular, o pico sérico de concentração é aproximadamente de 8µg/mL em duas horas (KUCERS *et al* 1987), com concentrações de nível sérico de 8 a 12 horas. A meia-vida é em torno de 6 horas, aumentando para 2 a 3 dias em pacientes anúricos (KUNIN *et al* 1967) após sete dias na dose de 2,5mg/kg/dia, por acumulação, o nível sérico de concentração pode chegar a 15µg/mL (HOPPER *et al* 1953). Entretanto, esses resultados têm sido questionados em recentes estudos que avaliaram a farmacocinética das polimixinas com metodologia apropriada para detecção dessas drogas no plasma ou soro (ZAVASCKI *et al* 2008; PLACHOURAS *et al* 2009)

Quando o colistimetato é administrado pela via intramuscular em adultos é alcançado um pico sérico de 5 a 7 µg/mL, mas quando é administrado por via intravenosa, o pico é em torno de 20µg/mL em 10 minutos. Em limitados estudos, o pico de colistina hidrolisada livre in vivo de colistimetato é muito menor que o pico de

colistimetato (em torno de 2µg/mL). A ligação da colistina (forma livre) às proteínas é em torno de 50%. Os níveis séricos de colistina são intermediários após administração de colistimetato (NATION *et al* 2007). O colistimetato se elimina intacto pela via renal (aproximadamente 60% nas primeiras 24 horas), enquanto que a colistina se elimina por vias diferentes não totalmente conhecidas. Não há descrição de excreção biliar (LI *et al* 2006; PLACHOURAS *et al* 2009). Um estudo determinou a concentração sérica da polimixina B1 (o maior constituinte do sulfato de polimixina B) em nove pacientes após uso endovenoso. A meia-vida encontrada foi de 13h (ELIAS 2010). Outro estudo usando polimixina B 0,5-1,25mg/kg a cada 12 horas, em infusão de 60 minutos, atingiu-se a concentração plasmática de 2,38-13,9 µg/mL após dois dias de tratamento, obtendo no sangue proteína sérica alta (78,5%-92,4%). Neste estudo, menos de 1% de polimixina B infundida foi recuperada inalterada na urina. Também se observou uma alta ligação proteica (>95%) e um volume de distribuição de aproximadamente 1,39L/kg (ZAVASCKI *et al* 2008).

Em pacientes com fibrose cística que receberam colistimetato, a meia-vida de colistimetato foi de aproximadamente de 2 horas e a meia-vida da colistina hidrolisada de colistimetato em torno de 4 horas. Acúmulo de ambas drogas decorrem de doses repetidas. Distribuição para líquido, trato biliar, líquido pleural e líquido sinovial é pobre. As polimixinas são pobremente dialisadas. Os níveis séricos das polimixinas após a inalação são muito baixos (RATJEN *et al* 2006).

3.9 FARMACODINÂMICA

Apenas um estudo examinou a farmacodinâmica na polimixina B observando que a dose diária (mas não a frequência de doses) sugere atividade bactericida, onde foi demonstrado que a concentração-dependente e parece estar mais relacionado com a parâmetro ASC/CIM (área sob a curva/ concentração mínima inibitória) (TAM *et al* 2005). Os demais estudos avaliaram a farmacodinâmica da colistina (LI *et al* 2005; LI *et al* 2006). Nestes estudos envolvendo as curvas de morte bacteriana ou time-kill curves, um novo crescimento foi observado após rápida redução inicial da lise bacteriana em todas as concentrações testadas (1-16 mg/L) (TAM *et al* 2005). Um modelo *in vitro* sugeriu que a administração de polimixinas três vezes ao dia poderia ser efetivo em suprimir a resistência (BERGEN *et al* 2008).

3.10 TOXICIDADE

Entre os efeitos adversos descritos com as polimixinas, encontram-se febre, erupção cutânea e dor no local da injeção. Entretanto, a toxicidade mais importante envolve o sistema nervoso e os rins (PEDERSEN *et al* 1971). A incidência de toxicidade renal é de 20-25% em paciente com dose recomendada. A nefrotoxicidade é dose dependente, sendo normalmente reversível. A função renal normalmente retorna ao nível basal em três a nove semanas (PRICE *et al* 1970). A polimixina causa necrose tubular aguda, manifestada por albuminúria, cilindros celulares, redução do débito urinário e elevação da ureia e creatinina (BROWN *et al* 1970; PRICE *et al* 1970; WOLINSKY *et al* 1962).

Após uma revisão sistemática envolvendo a toxicidade das polimixinas, FALAGAS *et al.* concluíram que a incidência da nefrotoxicidade com polimixinas é menos comum e menos severa, comparada com os estudos de 1970. A incidência de toxicidade renal foi demonstrada ser de 0% a 37% (FALAGAS *et al* 2006). Os efeitos podem ser reduzidos se na clínica forem considerados ajustes de dose de acordo com a função renal e deve-se evitar administrar concomitantemente drogas nefrotóxicas (FALAGAS *et al* 2006).

Um estudo retrospectivo (HARTZELL *et al* 2009; FALAGAS *et al* 2009) com colistimetato de sódio foi publicado e corrobora para considerar que a dose total e duração do tratamento de colistina estiveram associadas com nefrotoxicidade, e não a dose diária do antibiótico. O colistimetato de sódio demonstrou ocasionar disfunção renal leve na maioria dos pacientes em estudo; entretanto, disfunção renal permanente foi rara. Considera ainda que a avaliação periódica dos níveis de creatinina, modificação da dose, evitar fármacos nefrotóxicos concomitantes, encurtamento da duração do tratamento com polimixina e cuidados de hidratação tendem a minimizar os potenciais efeitos tóxicos (LAURA 2010).

Neurotoxicidade com polimixinas é considerada bem menos frequente, sendo resolvida após descontinuação da terapia da terapia (FALAGAS *et al* 2006), como mostra a publicação (WEINSTEIN *et al* 2009) de dois casos que reportam ter ocorrido parestesias em pacientes tratados com polimixina B intravenosa com infecção por bacilo Gram-negativo multirresistente, mas que reverteu após descontinuação do fármaco (WEINSTEIN *et al* 2009). Bloqueio e fraqueza neuromuscular foram constatados em dois estudos com polimixina B (SOBIESZCZYK *et al* 2004).

3.11 RESISTÊNCIA

A resistência a polimixinas é infrequente, provavelmente pelo escasso uso nas últimas décadas. Entretanto, recentemente se tem observado um fenômeno de heterorresistência em cepas de *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes, independentemente da exposição prévia à polimixinas (LAURA 2010). Desse modo, cepas teoricamente sensíveis apresentam subpopulações resistentes não detectáveis por métodos de diluição, o que teoricamente poderia condicionar o fracasso terapêutico (OWEN *et al* 2007). No entanto, o fenômeno de heterorresistência ainda é bastante controverso na literatura. Alguns autores se referem a esse fenômeno como resistência adaptativa (ZAVASCKI *et al* 2010; YAU *et al* 2009; SCHUREK *et al* 2009). Além disso, o significado clínico desse fenômeno não está estabelecido (ZAVASCKI *et al* 2009). O provável mecanismo de resistência às polimixinas são alterações na composição da molécula lipopolissacarídeo ou a substituição da proteína H1 por magnésio em outra membrana. Resistência à polimixina B confere tipicamente resistência para colistina e vice-versa (EVANS *et al* 1999).

Alguns estudos têm demonstrado que os isolados resistentes às polimixinas são geralmente sensíveis a outras classes de droga, por razão ainda não conhecidas (LI *et al* 2007; MENDES *et al* 2008; FALAGAS *et al* 2008).

3.12 ESTUDOS CLINICOS

3.12.1 ESTUDOS CLÍNICOS COM COLISTINA

Alguns trabalhos publicados com colistina seguem descritos como suporte para o retorno deste antimicrobiano na terapia no atual momento de aumento significativo de cepas multirresistentes.

Um grupo grego estudou 50 pacientes que receberam colistina para o tratamento de 54 episódios de infecções causadas por bacilos Gram-negativos multirresistentes. Os principais patógenos foram *Acinetobacter baumannii* (51,9%), *Pseudomonas aeruginosa* (42,6%) e *Klebsiella pneumoniae* (3,7%). A mortalidade hospitalar foi de 24%. Resposta clínica foi observada em 66,7% dos episódios. Níveis séricos de creatinina diminuíram no final do tratamento com tratamento. Perda da função renal durante a terapia com colistina foi observada em 8% dos pacientes (KASIAKOU *et al* 2005).

Um estudo, acompanhou pacientes muito grave por sepse por bacilos Gram-negativos multirresistentes. Os pacientes (n=24), receberam 26 cursos de colistina. Resposta clínica foi observada em 73% dos pacientes e a sobrevivência após 30 dias foi de 57,7%. Perda da função renal foi observada em 14,3% dos 21 pacientes que ainda não estavam realizando diálise, mas somente um dos pacientes apresentou anúria e necessitou diálise (MARKOU *et al* 2003).

O maior estudo de coorte foi realizado, durante um intervalo de 7 anos, quando foram investigados 258 pacientes que receberam colistina endovenosa por pelo menos 72 horas contra infecções por bacilos Gram-negativos multirresistentes incluindo *Acinetobacter baumannii* (170), *Pseudomonas aeruginosa* (68), *Klebsiella pneumoniae* (18), *Stenotrophomonas maltophilia* (1) e *Enterobacter cloacae* (1). Foram encontrados 79,1% de cura dos pacientes, com 10% de nefrotoxicidade e sobrevivência hospitalar de 65,1%. Variáveis independentes de sobrevivência foram a dose de colistina média diária e cura da infecção (FALAGAS *et al* 2010).

Infecções por *Klebsiella pneumoniae* foram mais comuns no grupo tratado com colistina devido a um surto em Israel por *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmico, enquanto *Acinetobacter baumannii* e outras bactérias Gram-negativas foram mais comuns no grupo tratado com imipenem, meropenem e ampicilina/sulbactam. Mais pacientes foram tratados com colistina por menos de 72 horas devido ao óbito precoce. Perda da função renal aconteceu mais frequentemente entre os pacientes tratados com colistina. Pacientes tratados com colistina evoluíram significativamente mais para choque séptico, tiveram maior duração de febre, mais infecções secundárias e maior tempo de internação. Foram observados casos de resistência à colistina (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia*) após 3 meses de tratamento (PAUL *et al* 2010).

3.12.2 ESTUDOS CLÍNICOS COM POLIMIXINA B

Não há estudos clínicos randomizados avaliando a eficácia da polimixina endovenosa para infecções causadas por bacilos Gram-negativos multirresistentes ou comparando a sua eficácia clínica com a colistina (ZAVASCKI *et al* 2007).

Um estudo no Brasil com 19 pacientes avaliou o resultado da polimixina B inalada para infecções por bacilos Gram-negativos multirresistentes como tratamento inicial para pneumonia (n=14) e traqueobronquites (n=5). A maioria dos pacientes (89%) estava em unidade de terapia intensiva (UTI). Entre os casos de pneumonia, 93%

apresentaram cura. Entretanto, 64% dos pacientes com pneumonia evoluíram para óbito durante hospitalização. Efeito adverso durante administração de polimixina B inalatória ocorreu em 21% mas não houve suspensão do tratamento. Destes efeitos, broncoespasmo foi predominante (PEREIRA *et al* 2007).

Em outro estudo brasileiro, conduzido por Zavascki e colaboradores, com 13 pacientes tratados com polimixina B intravenosa causada por *Pseudomonas aeruginosa* produtora de metalo- β -lactamase de dois hospitais de ensino, a mortalidade foi de 54% (ZAVASCKI *et al* 2006). Outro estudo publicado no Brasil com 74 pacientes com pneumonia nosocomial por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiplas drogas, tratados com a polimixina B intravenosa em infusão contínua, 47,3% apresentaram cura. Não houve dose média administrada. No estudo, 62,2% dos pacientes fizeram uso de monoterapia com essa droga e 37,8% receberam terapia concomitante, sendo a maioria associada com imipenem (32,4%). A taxa de mortalidade no hospital foi de 74,3% dos pacientes e a toxicidade renal encontrada foi de 9,5%. (FURTADO *et al* 2007)

Em estudo retrospectivo que avaliou a eficácia clínica e microbiológica e seguridade profilática da polimixina B intravenosa e/ou aerossol no tratamento de infecções por bacilos Gram-negativos multirresistentes do trato respiratório de pacientes críticos, como tratamento combinado de outros antimicrobianos, constatou-se uma mortalidade de 48%. A taxa de cura encontrada foi de 76%. A nefrotoxicidade observada foi de 10% e não houve descontinuidade da droga por este motivo. Os autores concluíram que polimixina B combinada com outros antimicrobianos pode ser considerado uma opção segura para limitado tratamento de infecções respiratórias com bacilos Gram-negativos multirresistentes (SOBIESZCZYK *et al* 2004).

3.13 REFERÊNCIAS

Bedford Laboratories. Polymyxin B for injections (package insert). Bedford, OH 44146. Bedford Laboratories; 2004.

BERGEN, P.J.; LI, J.; NATION, R.J. Comparison of once-, twice- and thrice-daily dosing of colistin on antibacterial effect and emergence of resistance: studies with *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro pharmacodynamics model. **Journal Antimicrobials Chemother.** 2008; 61: 636-642.

BROWN, C.M.; DORMAN, D.C.; ROY, L.P. Acute renal failure due to overdosage of colistin. **Medical Journal of Australia.** 1970; 2: 923-4.

CARLOS HENRIQUE CEZIMBRA KVITKO. Dissertação: Eficácia da polimixina B no tratamento de bacteremias por *Pseudomonas aeruginosa*. 2010. 80 pág. Ciências

Médicas. Faculdade de Medicina. Universidade federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, BR- RS.

DECOLIN, D.; LEROY, P.; NICOLAS, A.; ARCHIMBAULT, P. Hyphenated liquid chromatographic method for the determination of colistin residues in bovine tissues. **Journal of Chromatography Science** 1997;35:557–64.

EVANS, M.E.; FEOLA, D.J.; RAPP, R.P. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant Gram-negative bacteria. **Annals of Pharmacotherapy**. 1999; 33: 960-7.

FALAGAS, M.E.; KASIAKOU, S.K.; TSIODRAS, S.; MICHALOPOULOS, A. The use of intravenous and aerolized polymyxins for the treatment of infections in critically ill patients: a review of the recent literature. **Clinical Medicine Research**. 2006; 4: 138-46.

FALAGAS, M.E.; KASIAKOU, S.K. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. **Critical Care**. 2006; 10:R27.

FALAGAS, M.E.; BLIZIOTIS, I.A. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? **International Journal Antimicrobial Agents**. 2007; 29: 630-6.

FALAGAS, M.E.; RAFAILIDIS, P.I.; MATTHAIIOU, D.K.; VIRTZILI, S.; NIKITA, D.; MICHALOPOULOS, A. Pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections: characteristics and outcome in a series of 28 patients. **International Journal Antimicrobial Agents**. 2008; 32: 450-4.

FALAGAS, M.E.; RAFAILIDIS, P.I. Nephrotoxicity of colistin: new insight into and old antibiotic. **Clinical Infectious Diseases**. 2009; 48: 1729-31.

FALAGAS, M.E.; RAFAILIDIS, P.I.; IOANNIDOU, E.; ALEXIOU, V.G.; MATTHAIIOU, D.K.; KARAGEORGOPOULOS, D.E.; KAPASKELIS, A.; NIKITA, D.; MICHALOPOULOS, A. Colistin therapy for microbiologically documented multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: a retrospective cohort study of 258 patients. **International Journal Antimicrobial Agents**. 2010; 35: 194-9.

FURTADO, G.M.; D'AZEVEDO, P.A.; GALES, A.C.; PIGNATARI, A.C.; MEDEIROS, E.A. Intravenous polymyxin B for the treatment of nosocomial pneumonia caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal Antimicrobials Agents**. 2007; 30: 315-9.

GALES, A.C.; REIS, A.O; JONES, R.N. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. **Journal of Clinical Microbiology**. 2001; 39:183-90.

HANLON, G.W. The emergence of multidrug resistant *Acinetobacter* species: a major concern in the hospital setting. **Letters in Applied Microbiology**. 2005; 41: 375-8

HARTZELL, J.D.; NEFF, R.; AKE, J.; HOWARD, R.; OLSON, S.; PAOLINO, K.; VISHNEPOLSKY, M.; WEINTROB, A.; WORTMANN, G. Nephrotoxicity associated with intravenous colistin (colistimethate sodium) treatment at a tertiary care medical center. **Clinical Infectious Diseases**. 2009; 48: 1724-8.

HELFAND, M.S.; BONOMO, R.A. Current challenges in microbial chemotherapy: the impact of extended-spectrum beta-lactamases and metallo-beta-lactamases on the treatment of resistant Gram-negative pathogens. **Current Opinion in Pharmacology**. 2005; 5: 452-8.

HERMSEN, E.D.; SULLIVAN C.J.; ROTSCHAFER J.C. Polymyxins: pharmacology, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical applications. **Infectious Diseases Clinical North America** 2003;17 (3):545–62.

HOOVER, J.J.R.; JAWETZ, E.; HINMAN, F, JR. Polymyxin B in Chronic pyelonephritis: observations on the safety of the drug and on its influence on the renal infection. **American Journal Medicine Science**. 1953; 225: 402-9.

ITOKAZU, G.S.; QUINN, J.P.; BELL-DIXON, C.; KAHAN, F.M.; WEINSTEIN, R.A. Antimicrobial resistance rates among aerobic Gram-negative bacilli recovered from patients in intensive care units: evaluation of a national postmarketing surveillance program. **Clinical Infectious Diseases**. 1996; 23: 779-84.

JAIN, R.; DANZINGER, L.H. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: an emerging challenge to clinicians. **Annals of Pharmacotherapy**. 2004; 38: 1449-59.

JONES, R.N. Impact of changing pathogens and antimicrobial susceptibility patterns in the treatment of serious infections in hospitalized patients. **American Journal of Medicine**. 1996; 100: 3S-12S.

KANG, J.W.; SCHEPDAEL, V.A.; ORWA, J.A.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Analysis of polymyxin B sulfate by capillary electrophoresis with cyclodextrin as additive. Method development and validation. **Journal of Chromatography A**. 2000; 879: 211-8.

KASAIKOU, S.K.; MICHALOPOULOS, A.; SOTERIADES, E.S.; SAMONIS, G.; SERMAIDES, G.J.; FALAGAS, M.E. Combination therapy with intravenous colistin for management of infectious due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis. **Antimicrobial Agents Chemother**. 2005; 49: 3136-46.

KWA A, KASIAKOU S.K.; TAM V.H. Polymyxin B: similarities to and differences from colistin (polymyxin E). **Expert Review Antimicrobial Infections Therapy** 2007; 5(5): 811–21.

KUCERS, A. BENNETT, N.M. The use of antibiotics. A comprehensive review with clinical emphasis. 4th ed. Philadelphia: Lippincott; 1987: 905-17.

KUNIN, C.M. A guide to use of antibiotics in patients with renal disease. A table of recommended doses and factors governing serum levels. **Annals International of Medicine**. 1967; 67: 151-8.

LAURA DA SILVA ELIAS. Dissertação: Fatores de risco associados à mortalidade de pacientes tratados com polimixina B endovenosa. 2010. 78 pág. Ciências Médicas. Faculdade de Medicina. Universidade federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, BR-RS.

LI, J.; NATION, R.L.; MILNE, R.W.; TURNIDGE, J.D.; COUTHARD, K. Evaluation of colistin as an agent against multiresistant Gram-negative bacteria. **International Journal Antimicrobials Agents**. 2005; 25: 11-25.

LI, J.; RAYNER, C.R.; NATION, R.L.; OWEN, R.J.; SPELMAN, D.; TAM, K.E.; LIOLIOS, L. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents Chemother**. 2006; 50: 2946-50.

LI, J., NATION, R. L.; TURNIDGE, J. D.; MILNE, R. W.; COULTHARD, K.; RAYNER, C. R.; PATERSON, D. L. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. **Lancet Infectious Diseases** 2006; 6:589–601

LI, J.; NATION, R.L.; OWEN, R.J.; WONG, S.; SPELMAN, D.; FRANKLIN, C. Antibigrams of multidrug-resistant clinical *Acinetobacter baumannii*: promising therapeutic options for treatment of infection with colistin-resistant strains. **Clinical Infectious Diseases**. 2007; 45:594-8.

MARKOU, N.; APOSTOLAKOS, H.; KOUMOUDIOLU, C. Intravenous colistin in the treatment of sepsis from multiresistant Gram-negative bacilli in critically ill patients. **Critical Care**. 2003; 7: R78-83.

MENDES, R.E.; FRITSCH, T.R.; SADER, H.S.; JONES, R.N. Increased antimicrobial susceptibility profiles among polymyxin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **Clinical Infectious Diseases**. 2008; 46: 1324-6.

MENDES, C.A.C.; BURDMANN, E.A. Polimixinas – revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**. 2009; 55(6): 752-9.

MCGOWAN, J.E. JR. Resistance in nonfermenting Gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. **American Journal of Infection Control**. 2006; 34: S29-37.

MICHALOPOULOS, A.S.; KARATZA, D.C. Multidrug-resistant gram-negative infections: the use of colistin. **Expert Review Antimicrobial Infections Therapy** 2010;8 (9):1009–17.

NATION, L.; LI, J. Optimizing use of colistin and polymyxin B in the critically ill. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**. 2007; 28:604-614.

OWEN, R.J.; LI, J.; NATION, R.L.; SPELMAN, D. In vitro pharmacodynamics of colistin against multiresistant Gram-negative bacteria. **Journal Antimicrobials Chemother**. 2007; 59: 473-7.

PAUL, M.; BISHARA, J.; LEVCOVICH, A.; CHOWERS, M.; GOLDBERG, E.; SINGER, P.; LEV, S.; LEON, P.; RASKIN, M.; YAHAV, D.; LEIBOVICI, L. Effectiveness and safety of colistin: prospective comparative cohort study. **Journal Antimicrobials Chemother.** 2010; 65: 1019-27.

PEDERSEN, M.F.; PEDERSEN, J.F.; ADESN, P.O. A clinical and experimental comparative study of sodium colistimethate and polymyxin B sulfate. **Investigative Urology.** 1971; 9: 234-7

PEREIRA, G.M.; MULLER, P.R.; LEVIN, A.S. Salvage treatment of pneumonia and initial treatment of tracheobronchitis caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli with inhaled Polymyxin B. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.** 2007; 58, 235-40.

PLACHOURAS, D.; KARVANEM, M.; FRIBERG, L.E.; PAPADOMICHELAKIS, E.; ANTONIADOU, A.; KARAIKOS, I.; POLAKOU, G.; KONTOPIDOU, F.; ARMAGANIDIS, A.; CARS, O.; GIAMARELLOU, H. Population pharmacokinetic analysis of colistin methanesulfonate and colistin after intravenous administration in critically ill patients with infections caused by Gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents Chemother.** 2009; 53: 3430-6.

PRICE, D.J.; GRAHAM, D.I. Effects of large doses of colistin sulphomethate sodium on renal function. **British Medical Journal.** 1970; 4: 525-7

PULASKI, E..J.; BAKER, H.J. Laboratory and clinical studies of polymyxin B and E. **Journal of Clinical Investigation.** 1949; 28: 1028-31.

RAMPHAL,R.; AMBROSE, P.G. Extended-spectrum- beta –lactamases and clinical outcomes: current data. **Clinical Infectious Diseases.** 2006: 42: S164-72

RATJEN, F.; RIETSCHER, E.; KASEL, D. Pharmacokinetics of inhaled colistin in patients with cystic fibrosis. **Journal Antimicrobials Chemother.** 2006; 57: 306 – 311.

ROSSOLINI, G.M.; MANTENGOLI, E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Microbiology Infections.** 2005; 11:17-32.

SADER, H.S.; MENDES, C. F.; PIGNATARI, A.C.; PFALLER, M.A. Use of macrorestriction analysis to demonstrate interhospital spread of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in São Paulo, Brazil. **Clinical Infectious Diseases.**1996; 23: 631-4.

SOBIESZCZYK, M.E.; FURUYA,E.Y; HAY, C.M.; PANCHOLI, P.; DELLA-LATTA,P.; HAMMER, S.M.; KUBIN, C.J. combination therapy with Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant Gram-negative respiratory tract infections. **Journal Antimicrobials Chemother.** 2004; 54: 566 – 9.

SCHUREK, K.N.; SAMPAIO, J.L.; KIFFER, C.R.; SINTO, S.; MENDES, C.M.; HANCOCK, R.E. Involvement of pmrAB and phoPQ in polymyxin B adaptation and

inducible resistance in non-cystic fibrosis clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal Antimicrobials Chemother.** 2009; 53: 4345-51.

TAM, V.H.; SCHILLING, A.N.; VO, G.; KABBARA, S.; KWA, A.L.; WIEDEHOLD, N.P.; LEWIS, R.E. Pharmacodynamics of Polymyxin B against *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemother.** 2005; 49: 3624-30.

TAM, V.H, CHANG, K.T, ABDELRAOUF, K. Prevalence, resistance mechanisms, and susceptibility of multidrug-resistant bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemother.** 2010; 54(3):1160–4.

WENSTEIN, L.; DOAN, T.L.; SMITH, M.A. Neurotoxicity in patients treated with intravenous polymyxin B: two case reports. **American Journal of Health Systems Pharmacists.** 2009; 66: 345-7.

WOLINSKY, E.; HINES, J.D. Neurotoxic and nephrotoxic effects of colistin patients with renal disease. **New England Journal of Medicine.** 1962; 266: 759-62.

YAU, W.; OWEN, R.J.; POUDYAL, A.; BELL, J.M.; TURNIDGE, J.D.; YU, H.H.; NATION, R.L.; LI, J. In vitro pharmacodynamics of colistin against multidrug-resistant *Klebsiella Pneumoniae*. **Journal Antimicrobials Chemother.** 2008; 62: 1311-8.

ZAVASCKI, A.P.; GOLDANI, L.Z.; CAO, G.; SUPERTI, S.V.; LUTZ, L.; BARTH, A.L.; RAMOS, F.; BONIATTI, M.M.; NATIO, R.L.; LI, J. Pharmacokinetics of intravenous polymyxin B in critically ill patients. **Clinical Infectious Diseases.** 1996; 23: 631-4.

ZAVASCKI, A.P.; BARTH, A.L.; GONÇALVES, A.L.; MORO, A.L.; FERNANDES, J.F.; MARTINS, A.F.; RAMOS, F.; GOLDANI, L.Z. The influence of metallo-beta-lactamase production on mortality in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Journal Antimicrobials Chemother.** 2006; 58: 387-92.

ZAVASCKI, A.P.; GOLDANI, L.Z.; NATION, R.L. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. **Journal Antimicrobials Chemother.** 2007; 60: 1206 – 15.

ZAVASCKI, A.P.; LI, J.; NATION, R.L.; SUPERTI, S.V.; BARTH, A.L.; LUTZ, L.; RAMOS, F.; BONIATTI, M.M.; GOLDANI, L.Z. Stable polymyxin B susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter spp* despite persistent recovery of these organisms from respiratory secretions of patients with ventilator-associated pneumonia treated with this drug. **Journal of Clinical Microbiology.** 2009; 47: 3064-5.

ZAVASCKI, A.P.; CARVALHAES, C.G.; PICÃO, R.C.; GALES, A.C. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. **Expert Review Antimicrobial Infections Therapy.** 2010; 8: 71-93.

4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO

4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO

4.1 INTRODUÇÃO

As polimixinas são drogas antigas descobertas em 1947. Começaram a ser usadas por via parenteral em 1962 e a partir de 1980 deixaram de ser prescritas devido à sua nefrotoxicidade limitando-se ao uso tópico e oral (FALAGAS *et al* 2006). Mas o surgimento de bactérias Gram-negativas resistentes a todos os antibióticos até então conhecidos, houve a necessidade da retomada do uso endovenoso da polimixina. As duas polimixinas utilizadas são a polimixina B e colistina (polimixina E) (KVITKO 2010). A estrutura básica da polimixina B é composta pela mistura de componentes dos quais, B1 e B2 encontram-se em maiores proporções. Já a colistina (polimixina E) tem como componentes de maiores proporções em sua estrutura as frações A e B (DECOLIN *et al* 1997). Apenas um aminoácido difere a polimixina B da colistina (polimixina E) (KVITKO 2010).

A figura 2 apresenta a estrutura química geral das polimixinas e a tabela 3 mostra a massa molecular e fórmula molecular de cada uma das principais frações constituintes das polimixinas B e colistina (polimixina E).

Figura 2: Estrutura química geral das polimixinas.

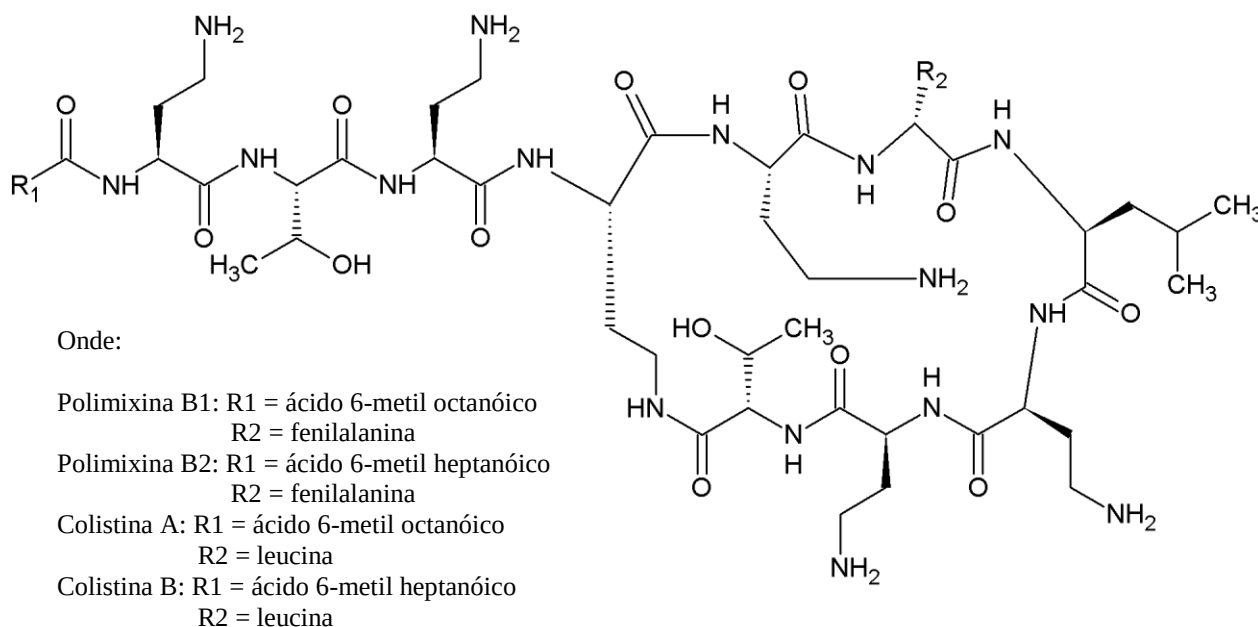


Tabela 3: Componentes da polimixina B e polimixina E

Polimixina	Massa Molecular	Fórmula molecular
B1	1204	$C_{56}H_{98}N_{16}O_{13}$
B2	1190	$C_{55}H_{96}N_{16}O_{13}$
E1 (colistina A)	1169	$C_{53}H_{100}N_{16}O_{13}$
E2 (colistina B)	1155	$C_{52}H_{98}N_{16}O_{13}$

Adaptado de KVITKO 2010

Para administração parenteral, a colistina (polimixina E) é utilizada sob a forma de colistimetato sódico (CMS), uma pró-droga inativa da colistina (BERGEN *et al.*, 2006), enquanto a polimixina B (ativo antibacteriano) é usado na forma de sulfato. CMS é obtido a partir da colistina por reação dos grupos livres γ -amino dos resíduos de Dab com formaldeído. Assim, no pH fisiológico, CMS é um poliânion. É importante ressaltar que a CMS não é uma forma de sal da colistina, mas uma entidade química diferente. Ambos CMS e polimixina B podem ser usados para o tratamento de infecções do trato respiratório. CMS é mais comumente usado, por exemplo, na América do Norte, América do Sul, Ásia, Europa e Austrália, enquanto a polimixina B parenteral é principalmente disponível nos EUA, Brasil e Singapura (BERGEN *et al*, 2012).

A produção relativamente escassa de novos antibióticos e o surgimento de cepas de bactérias Gram-negativas multirresistentes levou à reintrodução das polimixinas (polimixina B e colistina) intravenosas (IV) (BERLANA *et al*, 2005) como uma alternativa na terapia contra infecções causadas por tais patógenos. Uma série estudos clínicos publicados recentemente sugerem que colistina pode ser considerada no tratamento de pacientes com infecções bacterianas causadas por bactérias *Gram-negativas* MDR (multidroga resistente) (GRÉGOIRE, *et al* 2008; LI *et al* 2006; MICHALOPOULOS *et al* 2005; MICHALOPOULOS *et al* 2008; PLACHOURAS *et al* 2009).

Sendo a polimixina B e colistina, constituída por vários aminoácidos (polipeptídeo), a quantificação correta em matriz biológica para posteriores estudos farmacocinéticos é uma operação analítica com um acentuado grau de dificuldade devido fundamentalmente: (i) ao acentuado caráter polar dos compostos que resulta numa maior solubilidade em água do que a maioria dos solventes orgânicos geralmente usados; (ii) à ausência de propriedades intrínsecas dos compostos que possibilitem a sua

detecção diretamente por métodos espectrofotométricos, fluorimétricos ou electroquímicos; (iii) à extrema complexidade da matriz amostra; (iv) às concentrações em que se encontram estes compostos nas amostras; (v) à presença potencial de compostos interferentes, como diversos aminoácidos com semelhanças estruturais às aminas; (vi) à presença simultânea de aminas estruturalmente muito diferentes no mesmo extrato (GOUVEIA, 2009).

Da perspectiva qualitativa, a maior limitação da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a incapacidade de proporcionar uma identificação inequívoca dos componentes de uma mistura, mesmo que estejam completamente separados uns dos outros; uma vez que a identificação é baseada na comparação com padrões com tempos de retenção semelhantes. No entanto, existem muitos compostos com tempos de retenção semelhantes que co-eluem. Por outro lado, a dificuldade em obter separações completas de todos os componentes de uma mistura é outro ponto limitante da CLAE. O poder da espectrometria de massa reside no fato do espectro de massa de muitos compostos ser suficientemente específico para permitir a sua identificação com elevado grau de confiança, mesmo que haja co-eluição de vários compostos (GOUVEIA, 2009).

Não obstante à capacidade de separação característica dos métodos cromatográficos e os avanços na detecção dos analitos, a obtenção de bons resultados analíticos implica, muitas vezes, um processo prévio de extração/purificação dos compostos a analisar, que promova a remoção de interferências e a concentração das aminas presentes na amostra. Assim sendo, o processo de extração das aminas da matriz biológica é um passo crucial do procedimento analítico, podendo afetar negativamente a recuperação do método (GOUVEIA, 2009).

O processo de tratamento da amostra envolve uma série de etapas de modo a converter a matriz biológica numa solução adequada ao sistema LC-MS/MS, na qual os analitos são identificados e quantificados de forma fiável. A composição das amostras biológicas é extremamente complexa, contendo numerosos e diferentes compostos, variando desde extensas proteínas até sais orgânicos simples, que podem interferir negativamente com o sucesso da análise. Assim sendo, a preparação da matriz biológica para posterior quantificação dos analitos por LC-MS/MS é um passo importante para minimizar os efeitos de matriz nos resultados e deve assentar nos seguintes aspectos: (i) as perdas de amostra devem ser mínimas para obtenção de um bom rendimento dos analitos de interesse; (ii) remoção eficiente de potenciais interferências; (iii) concentração do analito; (iv) resultados independentes da variabilidade da matriz; (v) o

extrato final deve ser compatível tanto com a componente LC, como com o componente MS; (vi) conversão do analito a uma forma adequada à sua detecção; (vii) ser um processo adequado e rápido (TAYLOR, 2006).

Recentemente, métodos de LC-MS/MS, devido à sua alta sensibilidade e especificidade, foram desenvolvidos para a quantificação de polimixina E (colistina) no leite e nos tecidos animais (BERGEN *et al*, 2012). Métodos por LC-MS/MS também têm sido relatados para a análise da polimixina E no plasma humano e na urina (MA *et al*, 2008, GOBIN *et al* 2010).

O objetivo do estudo foi desenvolver e validar um método bioanalítico simples e rápido, para quantificação das frações B1, B2 da polimixina B e as frações A e B da colistina (polimixina E) no medicamento Sulfato de Polimixina B injetável adicionado ao meio de cultura Mueller Hinton.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Reagentes e padrões

As substâncias químicas de referência utilizadas na preparação dos padrões de calibração e nos controles de qualidade foram o sulfato de polimixina B (8131 unidades de potência – lote L0H010, USP), sulfato de colistina (63% de pureza – lote G, USP) e como padrão interno (PI) foi usada a leucina encefalina (lote w02110917, part number 700003276-1, Waters). O medicamento Sulfato de polimixina B 500.000 UI – pó liófilo para solução injetável, lote 237294B com validade 04/2014, Eurofarma, foi utilizado para determinação da proporção das frações constituintes das polimixina B e Colistina (polimixina E). A acetonitrila utilizada foi da marca J.TBaker, o ácido trifluoroacético foi da marca Vetec, a água ultra-pura foi obtida por um sistema Milli-Q-Plus (Millipore Corporation), o meio de cultura para crescimento de microorganismos foi o caldo Mueller Hinton lote 0000140338, Himedia e os *inserts* (vials) utilizados foram de polipropileno (lote 00136991, Agilent Technologies).

4.2.2 Plasma

As bolsas de plasma humano foram adquiridas junto à Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco – HEMOPE.

4.2.3 Soluções estoque e soluções de trabalho

As soluções estoque de sulfato de polimixina B e sulfato de colistina utilizadas no preparo das curvas de calibração e controles, foram preparadas a partir da pesagem do padrão com a pureza corrigida a fim de obter a concentração da base livre de 1mg/mL e de 10µg/mL para as soluções de trabalho. Todas as soluções estoque foram feitas utilizando água como solvente e guardadas em geladeira (2 a 8°C). As soluções de trabalho foram preparadas a cada dia de análise, pois foram obtidas a partir de diluições das soluções estoque em uma mistura de meio de cultura:plasma (50:50, v/v).

As soluções estoque utilizadas nos experimentos de microbiologia, descritos no capítulo 2, foram obtidas pela pesagem do padrão com a pureza corrigida e em sua forma de base livre a fim de obter a concentração de 10mg/mL da base livre e utilizando água estéril como solvente. Estas soluções foram guardadas em geladeira (2 a 8°C) e freezer a -20°C.

As soluções do padrão interno (PI) foram obtidas a partir da solubilização do conteúdo do frasco com água a fim de obter a concentração de 1mg/mL.

4.2.4 LC-MS/MS

O sistema de LC-MS/MS consistiu de um módulo de separação por cromatografia líquida de ultra-performance (UPLC) Acquity ultra (Waters, MI), equipado com bomba binária e autoinjeter termostaticamente controlado a 25°C acoplado a um detector de massas triplo quadropolo Quattro Premier (Micromass Waters, UK) com fonte de ionização eletrospray ESI.

A cromatografia de fase reversa consistiu de um gradiente de fluxo, descrito na tabela 1, e foi realizada com uma coluna BEH C18, 50 x 2,1 mm, 1,7µm. A fase móvel utilizada consistiu de água + 0,05% de ácido trifluoracético (TFA) (fase A) e acetonitrila (fase B). O volume de injeção foi de 20µL e o tempo de corrida de 10 min. Foi utilizado eletrospray positivo (ESI⁺) como modo de ionização. Para a transmissão e detecção dos íons, utilizou-se o modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM). Os íons precursores monitorados dos analitos foram os $[M + 2H]^{2+}$. As transições foram m/z 602,3 > 100,95 para polimixina B1, m/z 595,3 > 100,95 para polimixina B2, m/z 578,3,3 > 100,95 para polimixina E1 (colistina A) e m/z 585,3 > 100,95 para polimixina E2 (colistina B). A escolha do mesmo fragmento para quantificação (100,95) deveu-se pelo fato de ser o fragmento mais intenso e que apresentou melhor razão sinal/ruído. Como padrão interno (PI) foi usada a leucina-enkefalina e as transições foram m/z 556,5

> 120,1. Os parâmetros foram otimizados pela infusão de 10µL/min de solução de 10µg/mL de sulfato de polimixina, sulfato de colistina e PI. A melhor resposta para polimixina B foi obtida utilizando: capilar de +1.0 Kv; fluxo do gás de dessolvatação (N₂) de 800 L/hr; temperatura do gás de dessolvatação de 400°C; fluxo de gás do cone de 50 L/hr; temperatura da fonte de ionização de 110°C; potencial do cone de 40V; energia de colisão de 35V e 0,33ms de dwell time. Para a colistina, a melhor resposta foi obtida com os seguintes valores de parâmetros: capilar de +0.70 Kv; fluxo do gás de dessolvatação (N₂) de 800 L/hr; temperatura do gás de dessolvatação de 400°C; fluxo de gás do cone de 50 L/hr; temperatura da fonte de ionização de 110°C; potencial do cone de 37V; energia de colisão de 35V e 0,33ms de dwell time. Para o PI, os parâmetros foram: capilar de +0.70 Kv; fluxo do gás de dessolvatação (N₂) de 800 L/hr; temperatura do gás de dessolvatação de 400°C; fluxo de gás do cone de 50 L/hr; temperatura da fonte de ionização de 110°C; potencial do cone de 23V; energia de colisão de 35V e 0,33ms de dwell time.

Tabela 4: Gradiente da cromatografia, onde: % A (água + TFA 0,05%) e %B (acetonitrila)

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	% A	%B
0,0	0,05	78,5	21,5
2,0	0,05	78,5	21,5
3,0	0,1	50,0	50,0
3,9	0,1	50,0	50,0
4,0	0,1	0,1	99,9
4,9	0,1	0,1	99,9
5,0	0,05	50,0	50,0
5,9	0,05	50,0	50,0
6,0	0,05	78,5	21,5
10,0	0,05	78,5	21,5

4.2.5 Proporção das frações constituintes das polimixinas

Para a validação do método bioanalítico, foram consideradas as purezas declaradas pelo fabricante dos padrões para a correção na pesagem dos mesmos. A pureza (considerando a base livre) do padrão de sulfato de polimixina B foi de 96,7% e do padrão de sulfato de Colistina, 63%.

As polimixinas B e colistina (polimixina E), utilizadas na terapia são compostas basicamente pelas frações B1 e B2 e E1 (colistina A) e E2 (colistina B), respectivamente. Não existem padrões disponíveis das frações constituintes das polimixinas (B1, B2, E1 e E2) separadamente. O padrão de polimixina B utilizado nesta validação consiste em um padrão que apresenta a mistura de B1 e B2 e da polimixina E (colistina), uma mistura de E1 e E2. A proporção entre eles foi calculada dividindo a área de cada pico pela soma total de picos observados no cromatograma.

A faixa linear de trabalho, para ambas polimixinas, foi de 100 ng/mL a 10500 ng/mL (considerando a soma das frações). A tabela 2 mostra os dados gerais do método além das proporções das frações nas concentrações referentes ao LIQ, CQB, CQM, CQA e LSQ.

Tabela 5: Informações gerais sobre o método

Parâmetros	Especificação
Analito(s)	Frações B1 e B2 (polimixina B), A e B (Colistina)
P.I. (s)	Leucina encefalina
Matriz biológica	Meio de cultura: plasma (50:50, v/v)
Tipo de extração	Precipitação de proteínas
Quantificação	Resposta (área analito/área do P.I.)
Linearidade	100 a 10500 ng/mL
Limite inferior de Quantificação (LIQ – 100ng/mL)*	76,4 ng/mL (B1); 23,6 ng/mL (B2); 17,9 ng/mL (E1); 82,1 ng/mL (E2)
Controle de qualidade baixo (CQB – 200ng/mL)*	152,8 ng/mL (B1); 47,2 ng/mL (B2); 35,8 ng/mL (E1); 164,2 ng/mL (E2)
Controle de qualidade médio (CQM – 6000ng/mL)*	4584,0 ng/mL (B1); 1416,0 ng/mL (B2); 1074,0 ng/mL (E1); 4926,0 ng/mL (E2)
Controle de qualidade alto (CQA – 8400ng/mL)*	6417,6 ng/mL (B1); 1982,4 ng/mL (B2); 1503,6 ng/mL (E1); 6896,4 ng/mL (E2)
Limite superior de Quantificação (LSQ – 10500ng/mL)*	8022 ng/mL (B1); 2478 ng/mL (B2); 1879,5 ng/mL (E1); 8620,5 ng/mL (E2)

*Concentração equivalente à soma das frações B1 + B2 para a polimixina B e A +B para a colistina (polimixina E)

4.2.6. Parâmetros de validação

Os critérios de aceitação considerados na validação referem-se à RDC Nº27 de 17 de maio de 2012, ANVISA. Os parâmetros avaliados na validação foram: seletividade, recuperação, precisão e exatidão, linearidade, estabilidade de solução e estabilidade pós-processo. O ensaio de seletividade foi avaliado a partir das áreas obtidas pela análise da mistura meio de cultura:plasma extraído como branco, 5 LIQ e 5 PI, ambos extraídos da mistura meio de cultura:plasma. Para a avaliação da recuperação não foi possível a comparação das áreas das amostras extraídas da mistura meio de cultura:plasma frente às soluções pois as últimas apresentaram áreas mais baixas, inviabilizando os cálculos para comparação. Esta resposta cromatográfica das soluções pode ser explicada pela baixa ionização ou adsorção da molécula ao *insert* pela ausência da proteína plasmática resultando em uma baixa resposta cromatográfica. Por esse motivo, a avaliação da recuperação foi realizada através da comparação entre as áreas (05 CQB e 05 CQA) dos picos cromatográficos de amostras extraídas da mistura meio de cultura:plasma e amostras extraídas apenas do plasma. A precisão e exatidão do método foram avaliadas analisando 05 amostras de LIQ, 05 amostras de CQB, 05 amostras de CQM e 05 amostras de CQA extraídos em 3 diferentes sequências analíticas. O ensaio de linearidade foi realizado com a análise em triplicata dos níveis de concentração das curvas de calibração das três sequências de precisão e exatidão.

Para a estabilidade de solução foram avaliados os percentuais de degradação dos analitos e PI em soluções estoques de polimixina B e polimixina E utilizadas no desenvolvimento e validação do método bioanalítico. As soluções foram mantidas sob refrigeração (2 a 8°C) durante 5 e 8 dias. Da mesma forma, foram avaliadas as soluções estoque de polimixina B utilizadas nos experimentos de microbiologia, sendo que, neste caso, as soluções foram mantidas sob refrigeração (2 a 8°C) e em freezer (-20°C). Para este estudo, foram preparadas soluções, usando água como solvente, de acordo com o descrito no item 3.2.3; a partir delas foram preparados 5 CQB e 5 CQA de cada um dos analitos em meio de cultura:plasma. Em seguida, procedeu-se a extração e análise. A estabilidade de pós-processo, que avalia a estabilidade dos analitos na matriz após procedimento de extração e mantida na temperatura de análise por um período superior ao intervalo de tempo entre o término de preparo das amostras e final da corrida analítica mais longa, foi realizada com a análise de 5 CQB e 5 CQA. As amostras foram extraídas, permaneceram posicionadas no auto-injetor na temperatura de 25°C.

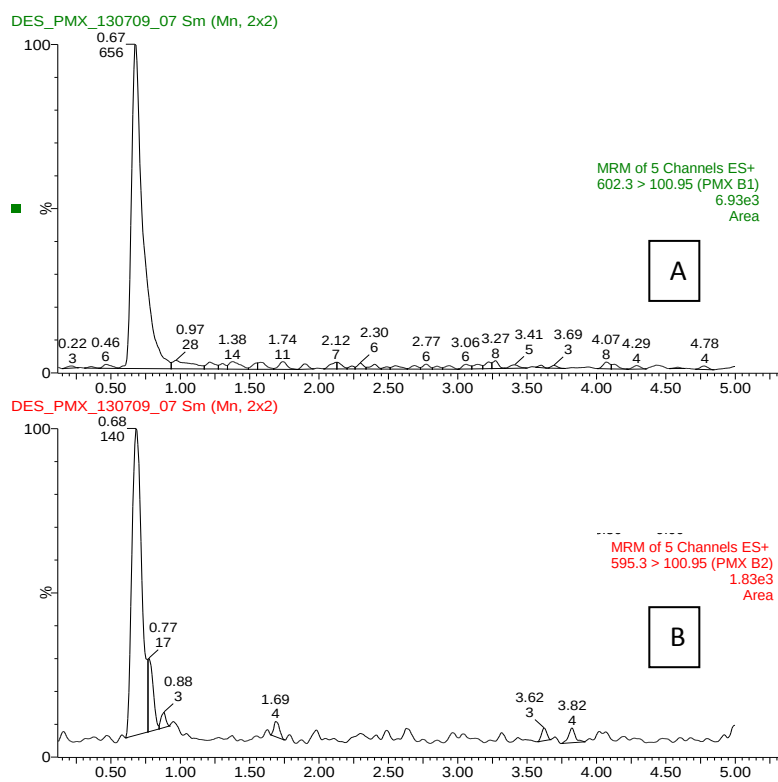
Depois de 24h, as amostras foram analisadas juntamente com curva e conjunto de 5 CQB e 5 CQA recém preparado e extraído.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Desenvolvimento do método bioanalítico

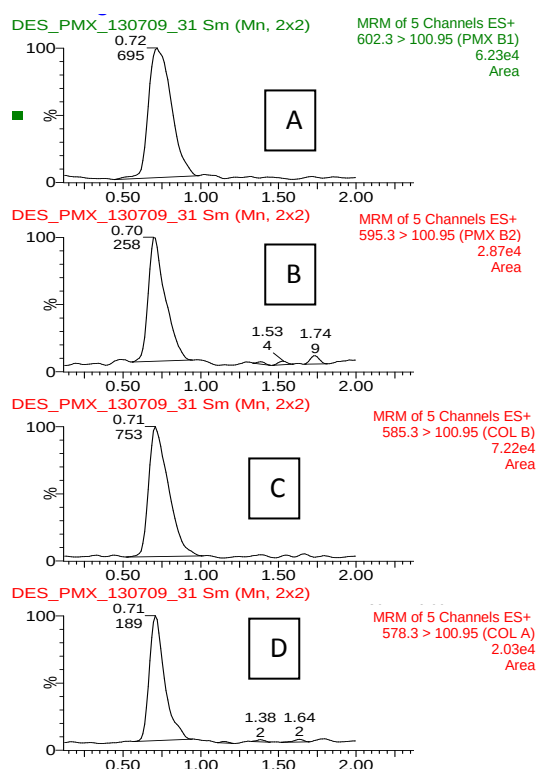
Para a fragmentação das moléculas de polimixina B e colistina, soluções de cada substância foram preparadas com concentração da base livre igual de 1mg/mL em água e soluções de trabalho a 10µg/mL em acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico. A fragmentação foi realizada em modo positivo e negativo. Ao fazer vários testes de composição de fase móvel para uma melhor cromatografia, o modo de ionização positivo foi escolhido por permitir uma cromatografia passível de reprodução. A figura 3 mostra um cromatograma obtido utilizando uma corrida isocrática. Embora o tempo de corrida se mostre útil para utilização em um método bioanalítico e boa razão sinal/ruído, nestas condições, o método não apresentou reprodutibilidade.

Figura 3: Cromatograma da fração B1 (figura A) e fração B2 (figura B) de polimixina B obtido a partir de solução a 100ng/mL, em um fluxo de 0.2 mL/min e composição de fase móvel: 20% A (água 0.1% ácido fórmico) 80% B (acetonitrila).



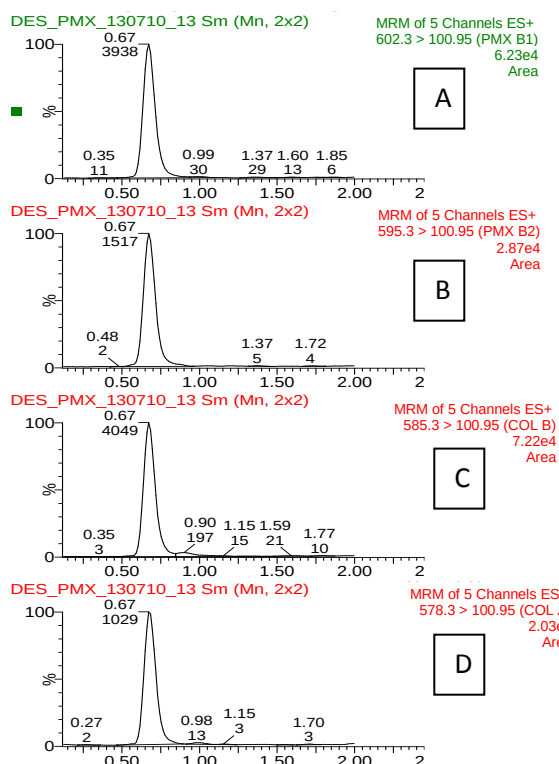
A figura 4 mostra o cromatograma da análise de uma mistura contendo polimixina B e colistina na concentração de 500 ng/mL com fluxo: 0.2 mL/min e fase móvel constituída por 15% A (água 0.1% ácido fórmico) 85% B (acetonitrila).

Figura 4: Cromatograma da fração B1 (figura A) e fração B2 (figura B) de polimixina B, além das frações B (figura C) e A (figura D) da colistina, obtido a partir de uma solução 500ng/mL, em um fluxo de 0.2 mL/min e composição de fase móvel :15% A (água 0.1% ácido fórmico) 85% B (acetonitrila).



As condições de cromatografia representadas na figura 3 apresentaram resultados razoáveis e para melhorar a reprodutibilidade inter e intracorridas e sensibilidade, foram testadas as mesmas condições de cromatografia variando a temperatura do forno de 40°C para 60°C e 80°C. O melhor resultado, principalmente no que se refere à sensibilidade, foi obtido com a temperatura do forno a 80°C. Uma pequena variação na composição de fase móvel foi feita visando uma harmonia entre a temperatura do forno e composição de fase móvel para obtenção de melhores resultados, mas a reprodutibilidade ainda não estava bem estabelecida. A figura 5 mostra o cromatograma obtido com as novas condições de fase móvel e temperatura de forno à 80°C.

Figura 5: Cromatograma da fração B1 (figura A) e fração B2 (figura B) de polimixina B, além das frações B (figura C) e A (figura D) da colistina, obtido a partir de uma solução 1000ng/mL, em um fluxo de 0.2 mL/min e composição de fase móvel :17% A (água 0.1% ácido fórmico) 83% B (acetonitrila) e forno a 80°C.



Outro fator bastante relevante residiu no fato de que, pequenas variações na proporção de fase móvel resultaram em cromatogramas completamente diferentes e irreprodutíveis. Foram testadas fases aquosas com ácido fórmico, DBSA (ácido dodecil benzeno sulfônico) e TFA (ácido trifluoroacético). A fase orgânica consistiu sempre em acetonitrila para que o sinal não fosse diminuído. A tabela 6 mostra as fases móveis testadas. De todos os testes realizados, o melhor resultado obtido foi utilizando como fase aquosa água + TFA. Foi realizado um estudo para identificar a melhor concentração do ácido, que foi dada por água + TFA 0,05%. Assim, após padronização da cromatografia, o método de extração passou a ser delineado.

Tabela 6: Composições de fase móvel

Fase A (água) %	Aditivo	Concentração do aditivo	Fase B (acetonitrila) %
20	Ácido fórmico	0,1%	80
15	Ácido fórmico	0,1%	85
17	Ácido fórmico	0,1%	83
20	DBSA	5mMol	80
17	Ácido fórmico	0,1%	83
75	TFA	0,03%	25
78	TFA	0,03%	22
70	TFA	0,03%	30
85	TFA	0,03%	15
80	TFA	0,04%	20
80	TFA	0,05%	20
78	TFA	0,05%	22

Inicialmente, como o objetivo do trabalho foi quantificar a polimixina B e Colistina (Polimixina E) no medicamento injetável Polimixina B adicionado ao meio de cultura, foi testada a extração por precipitação de proteínas com acetonitrila diretamente no meio de cultura, mas os resultados não se mostraram satisfatórios. Segundo Jansson e colaboradores (2008) um problema específico é a adsorção da colistina (Polimixina E) em diversos materiais utilizados em laboratório e para resolver este problema e fazer a quantificação em meio de cultura, uma mistura em igual volume de meio de cultura e plasma pode ser feita para evitar a adesão da colistina ao plástico favorecendo sua ligação às proteínas do plasma e a partir de então, extrair os analitos das proteínas do plasma e quantificar. Devido à semelhança estrutural da polimixina B e Colistina (Polimixina E), foram realizados os procedimentos descritos anteriormente também para a polimixina B. Então, para a extração dos analitos de um volume de 100 µL da mistura meio de cultura: plasma foram adicionados 200 µL de PI (Leucina encefalina 1µg/mL em acetonitrila + 0,1% TFA à -20°C) e em seguida agitou-se por 5 segundos no vórtex. A mistura foi centrifugada a 5.000 rpm a 15°C por 6 minutos e o sobrenadante (100 µL) foi transferido para tubos de fundo cônico de 2mL e acrescidos de 200 µL de TFA 0,05%, em seguida agitou-se 5 segundos no vórtex. A nova mistura foi centrifugada a 5.000 rpm a 15°C por 3 minutos e o sobrenadante foi transferido para os *inserts*.

Com o método de extração definido, a cromatografia precisou de ajustes. Não foi possível trabalhar com fase móvel isocrática, assim, o gradiente descrito na tabela 1, serviu para uma lavagem da coluna entre as injeções e por esse motivo o método ficou com tempo de corrida de 10 minutos. A melhor fase de lavagem foi água + TFA 0,05%. A reprodutibilidade foi conseguida e a validação foi realizada. A tabela 7 mostra as condições de cromatografia da validação e as figuras 6 e 7 mostram cromatogramas obtidos durante a validação do método.

Tabela 7: Condições de cromatografia

Descrição	Especificação
Fase móvel	Água + 0,05% TFA :Acetonitrila
Coluna cromatográfica	BEH C18, 50 x 2.1 mm, 1,7µm
Pré-coluna	BEH C18, 5 x 2,1mm, 1,7µm
Temperatura da coluna	80 °C
Pressão típica da coluna	410 psi (no início do gradiente)
Volume de injeção	20 µL
Temperatura do autoinjeter	25 °C
Tempo de retenção dos analitos	4,62 min (B1), 4,60 min (B2); 4,58 min (A); 4,62 min (B)
Tempo de retenção padrão interno	4,71min
Tempo de análise	10,0 min

Figura 6: Cromatograma da extração do LSQ (10500ng/mL) das frações B1 (figura A) e fração B2 (figura B) de polimixina B e PI (figura C).

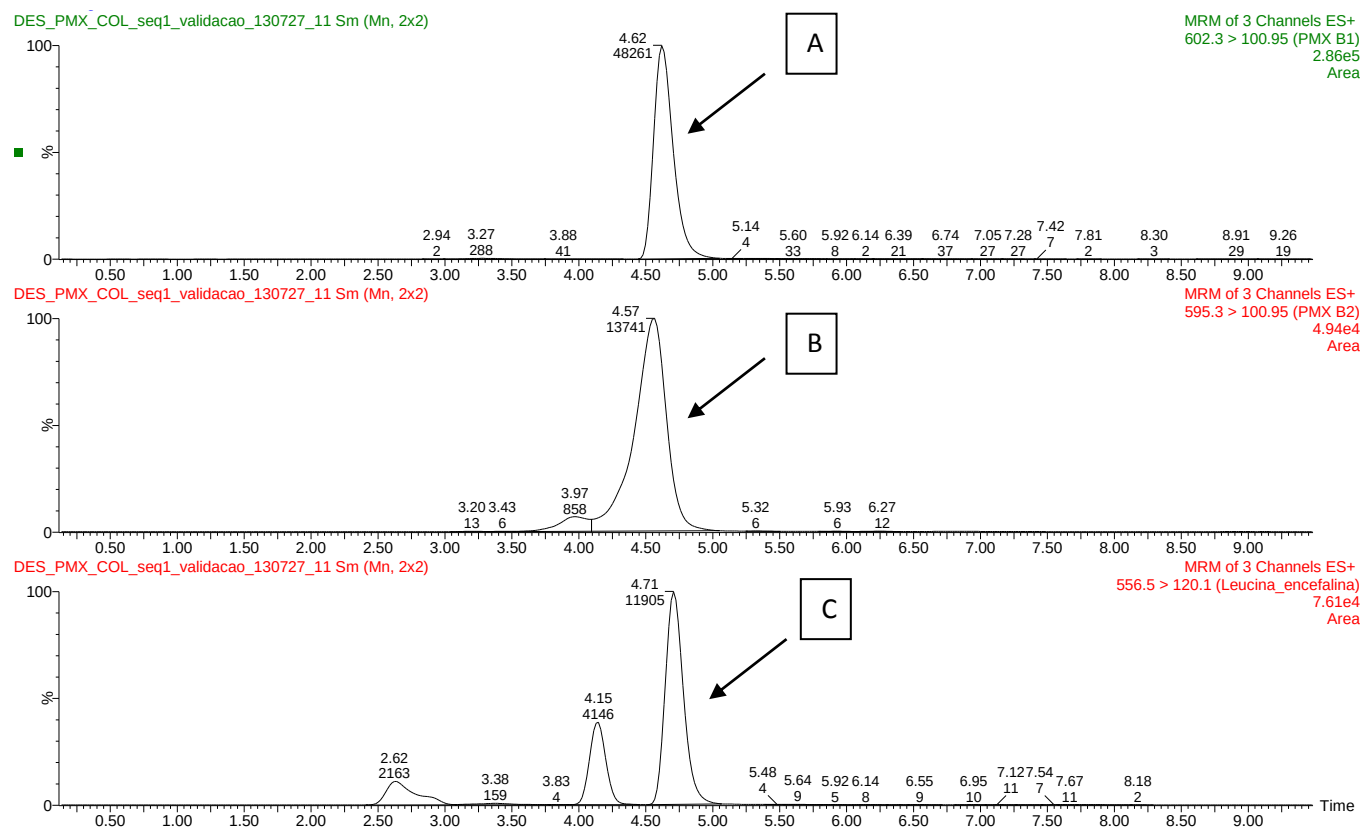
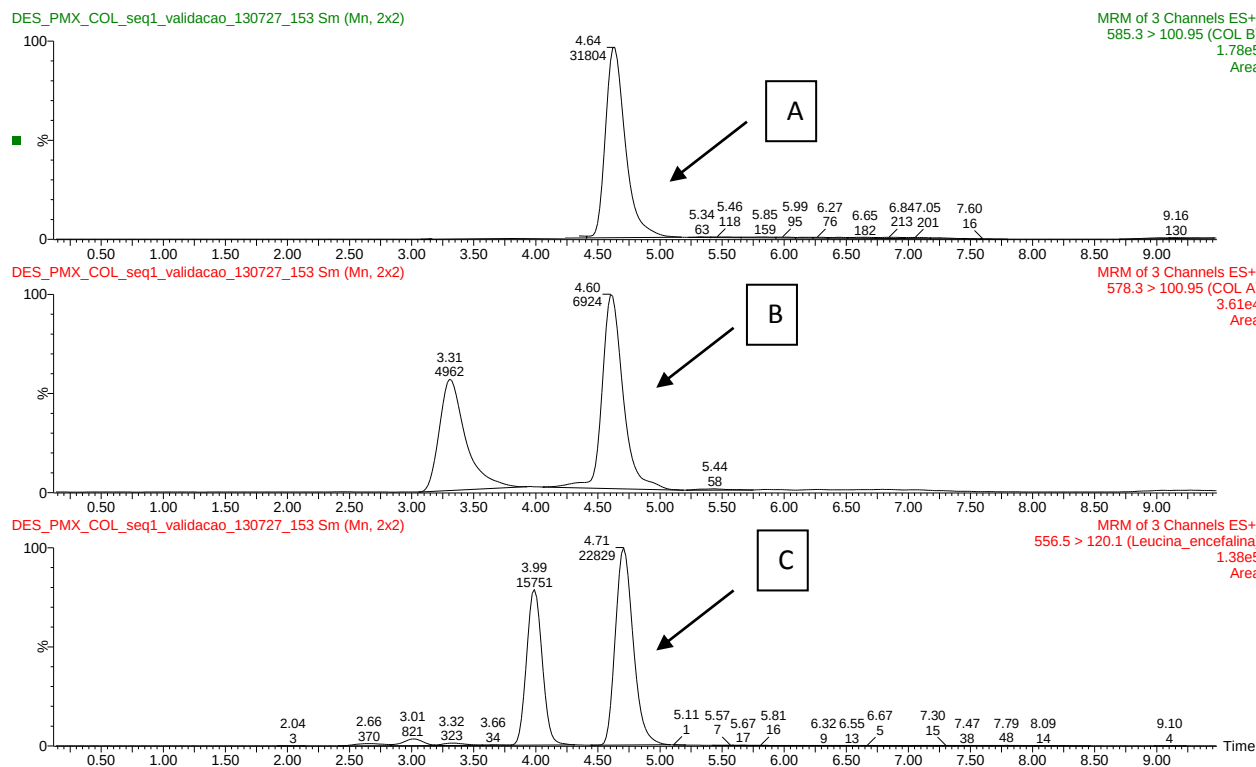


Figura 7: Cromatograma mostrando o resultado da extração do CQB (200ng/mL) das frações B (figura A) e fração A (figura B) de Colistina (polimixina E) e PI (figura C).



4.3.2 Validação de método bioanalítico

4.3.2.1 Determinação da proporção das frações constituintes dos padrões de polimixina B e colistina (polimixina E)

Para a realização do cálculo utilizou-se os dados gerados pela análise do LSQ extraído (meio de cultura:plasma) de uma curva de calibração. Os resultados podem ser vistos nas tabelas 8 e 9.

As tabelas mostram que o padrão de sulfato de polimixina B é composto por 76,4% de B1 e 23,6% de B2 e o padrão de sulfato de colistina é composto de 17,9% de colistina A e 82,1% de Colistina B. Essas proporções foram levadas em consideração para todos os parâmetros de validação com exceção da seletividade.

Tabela 8: Proporção das frações constituintes da polimixina B

	B1	B2	Soma
Área 1	97092	30044	127136
Área 2	95831	29531	125362
Média	96461,5	29787,5	126249
Proporção (%)	76,41	23,59	

Tabela 9: Proporção das frações constituintes da colistina (polimixina E)

	A (E1)	B (E2)	Soma
Área 1	36534	180147	216681
Área 2	43593	187524	231117
Média	40063,5	183835,5	223899
Proporção (%)	17,89	82,11	

4.3.2.2 Seletividade

As Tabelas 10 e 11 mostram os valores de áreas referentes ao branco (meio de cultura:plasma), LIQ e PI de polimixina B e colistina extraídos no ensaio de seletividade. Os resultados mostram que o interferente do branco corresponde a 9,5% da área do LIQ em ambos os analitos e como o mesmo permanece constante e menor que o especificado (até 20%), o método pôde ser validado.

Tabela 10: Resultados da seletividade para a polimixina B

	Branco	LIQ	PI
Área 1	114	1262	10943,606
Área 2	111	1117	10673,933
Área 3	109	1202	13259,004
Área 4	107	1020	13194,070
Área 5	110	1202	13482,881
média	110,2	1160,6	12310,7
DP	2,59	94,05	1378,55
CV(%)	2,35	8,10	11,20

Tabela 11: Resultados da seletividade para Colistina

	Branco	LIQ	PI
Área 1	41	120	8683,323
Área 2	46	156	7292,372
Área 3	41	161	7019,208
Área 4	37	131	9366,937
Área 5	38	117	8231,785
média	40,6	137	8118,725
DP	3,51	20,38	972,29
CV(%)	8,64	14,88	11,98

4.3.2.3 Recuperação

Os resultados obtidos na análise da recuperação mostram que as frações constituintes foram recuperadas de maneira uniforme para ambas as polimixinas. A recuperação das frações de polimixina B ficou em torno de 50% para o CQB e 98% para o CQA. No caso da colistina, o resultado obtido foi de 100% para CQB e 80% para o CQA, aproximadamente. A recuperação do PI foi de 100% para CQB e 94% para CQA, aproximadamente. As tabelas 12, 13, 15 e 16, mostram a recuperação das frações. As tabelas 14 e 17 mostram o percentual recuperado considerando a soma das frações. A tabela 18 mostra os resultados de recuperação do PI. Para todos os analitos, a recuperação foi acima de 50% mostrando-se satisfatória.

Tabela 12: Recuperação, no nível de CQB, da polimixina B (considerando as duas frações constituintes separadamente)

	CQB (200ng/mL)					
	Plasma			Meio de cultura:plasma		
	B1	B2	SOMA	B1	B2	SOMA
Área 1	2216	641	2857	1112	347	1459
Área 2	2162	585	2747	1109	327	1436
Área 3	2466	692	3158	1182	343	1525
Área 4	2544	694	3238	1206	383	1589
Área 5	2603	689	3292	1372	383	1755
média	2398,2	660,2	3058,4	1196,2	356,6	1552,8
DP	197,98	47,45	242,01	107,12	25,23	127,88
CV (%)	8,26	7,19	7,91	8,95	7,08	8,24
Recuperação (%)	49,88	54,01				

Tabela 13: Recuperação, no nível de CQA, da polimixina B (considerando as duas frações constituintes separadamente)

	CQA (8400ng/mL)					
	Plasma			Meio de cultura:plasma		
	B1	B2	SOMA	B1	B2	SOMA
Área 1	94484	26202	120686	84420	25222	109642
Área 2	93305	25910	119215	82867	24529	107396
Área 3	82320	23185	105505	86672	24531	111203
Área 4	83651	24224	107875	87204	25662	112866
Área 5	83305	23315	106620	85593	24430	110023
média	87413	24567,2	111980,2	85351,2	24874,8	110226
DP	5951,51	1420,56	7342,44	1751,73	542,18	2019,61
CV (%)	6,81	5,78	6,56	2,05	2,18	1,83
Recuperação (%)	97,64	101,25				

Tabela 14: Recuperação da polimixina B (considerando a soma das duas frações constituintes)

	Polimixina B			
	Plasma		Meio de cultura:Plasma	
	CQB	CQA	CQB	CQA
Área 1	2857	120686	1459	109642
Área 2	2747	119215	1436	107396
Área 3	3158	105505	1525	111203
Área 4	3238	107875	1589	112866
Área 5	3292	106620	1755	110023
média	3058,4	111980,2	1552,80	110226
DP	242,01	7342,44	127,88	2019,61
CV(%)	7,91	6,56	8,24	1,83
Recup. (%)	50,77	98,43		

Tabela 15: Recuperação, no nível de CQB, da Colistina (considerando as duas frações constituintes separadamente)

	CQB (200ng/mL)					
	Plasma			Meio de cultura:plasma		
	A	B	SOMA	A	B	SOMA
Área 1	563	2266	2829	577	2141	2718
Área 2	526	2191	2717	587	2201	2788
Área 3	615	2200	2815	569	2257	2826
Área 4	537	2229	2766	581	2184	2765
Área 5	546	2317	2863	554	2398	2952
média	557,4	2240,6	2798	573,6	2236,2	2809,8
DP	34,93	51,78	57,14	12,76	99,55	88,59
CV (%)	6,27	2,31	2,04	2,22	4,45	3,15
Recuperação (%)	102,91	99,80				

Tabela 16: Recuperação, no nível de CQA, da Colistina (considerando as duas frações constituintes separadamente)

	CQA (8400ng/mL)					
	Plasma			Meio de cultura:plasma		
	A	B	SOMA	A	B	SOMA
Área 1	25269	106506	131775	22471	88418	110889
Área 2	25220	104819	130039	23618	88877	112495
Área 3	25793	108646	134439	22772	88829	111601
Área 4	25301	105633	130934	21598	85443	107041
Área 5	26217	109553	135770	22031	88244	110275
média	25560	107031,4	132591,4	22498	87962,2	110460,2
DP	433,96	2005,72	2421,02	767,84	1433,68	2082,72
CV (%)	1,70	1,87	1,83	3,41	1,63	1,89
Recup. (%)	88,02	82,18				

Tabela 17: Recuperação da Colistina (considerando a soma das duas frações constituintes)

	Polimixina E			
	Plasma		Meio de cultura:Plasma	
	CQB	CQA	CQB	CQA
Área 1	2829	131775	2718	110889
Área 2	2717	130039	2788	112495
Área 3	2684	134439	2811	111601
Área 4	2766	130934	2765	107041
Área 5	2863	135770	2967	110275
média	2771,8	132591,4	2809,80	110460,2
DP	74,72	2421,02	94,37	2082,72
CV(%)	2,70	1,83	3,36	1,89
Recup. (%)	101,37	83,31		

Tabela 18: Recuperação do PI

	Padrão interno (1000ng/mL)			
	Meio de cultura:Plasma		Plasma	
	CQB	CQA	CQB	CQA
Área 1	10619,440	10309,601	9709,068	10812,950
Área 2	9711,600	10521,139	9981,795	11338,063
Área 3	10516,473	10035,033	10452,155	10861,020
Área 4	10103,823	10235,661	10003,062	10500,428
Área 5	10379,588	10017,901	10263,163	10647,708
média	10266,18	10223,87	10081,85	10832,034
DP	365,45	208,53	285,13	316,71
CV(%)	3,56	2,04	2,83	2,92
Recup. (%)	101,83	94,39		

4.3.2.4 Precisão e exatidão

Os resultados de precisão e exatidão (CV $\pm$ 20% para LIQ e $\pm$ 15% para demais controles) descritos na tabela 19 e 20 mostraram-se satisfatórios para todos os analitos. O método foi considerado preciso e exato por apresentar 3 lotes dentro das especificações.

Tabela 19: Precisão e exatidão da polimixina B

		Polimixina B											
		LIQ (100ng/mL) ^a			CQB (200ng/mL) ^a			CQM (6000ng/mL) ^a			CQA (8400ng/mL) ^a		
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
	Conc.1	82,81	115,61	108,76	171,75	214,61	178,44	5903,81	5958,43	6385,14	8081,37	8220,69	8688,65
	Conc. 2	115,72	92,09	104,42	177,61	206,20	171,62	5770,92	6052,34	6096,30	8344,23	7427,25	9330,41
	Conc. 3	113,72	111,31	102,61	180,14	222,08	201,58	5868,18	5577,19	6608,51	8086,15	8119,90	9110,25
	Conc. 4	108,59	90,77	100,69	171,20	226,66	186,06	6030,13	6012,73	6212,71	8377,49	8233,77	9583,93
	Conc. 5	104,07	113,95	99,54	202,55	215,25	173,51	5749,58	6074,67	6490,52	8562,69	7934,60	9026,98
Repet.	média	104,98	104,75	103,21	180,65	216,96	182,24	5864,52	5935,07	6358,63	8290,39	7987,24	9148,04
	DP	13,20	12,26	3,62	12,82	7,82	12,17	112,87	204,87	206,55	206,18	335,13	335,55
	CV (%)	12,57	11,71	3,51	7,10	3,60	6,68	1,92	3,45	3,25	2,49	4,20	3,67
	Exat. (%)	104,98	104,75	103,21	90,32	108,48	91,12	97,74	98,92	105,98	98,70	95,09	108,91
Reprod.	média	104,31			193,28			6052,74			8475,22		
	DP	9,86			20,19			280,78			579,07		
	CV (%)	9,45			10,44			4,64			6,83		
	Exat. (%)	104,31			96,64			100,88			100,90		

a = considerando a soma das frações constituintes da polimixina B

Tabela 20: Precisão e exatidão da Colistina (Polimixina E)

		Colistina											
		LIQ (100ng/mL) ^b			CQB (200ng/mL) ^b			CQM (6000ng/mL) ^b			CQA (8400ng/mL) ^b		
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
	Conc.1	111,85	118,93	103,10	225,67	240,05	200,56	5358,35	5736,08	5335,51	8344,90	7533,58	7956,41
	Conc. 2	98,68	119,98	101,75	206,78	217,96	180,72	5485,15	5668,80	5469,98	8169,45	7502,62	7744,45
	Conc. 3	113,47	112,50	106,05	205,57	221,83	187,05	5346,66	5815,25	5577,37	8125,38	7726,79	7985,33
	Conc. 4	102,34	107,31	100,91	205,49	215,52	195,18	5549,53	5732,03	5944,04	9482,09	7310,94	7851,38
	Conc. 5	111,15	112,34	106,75	194,96	196,12	202,81	5380,85	5840,97	5693,36	9345,02	7602,33	7832,65
Repet.	média	107,50	114,21	103,71	207,69	218,30	193,26	5424,11	5758,63	5671,19	8693,37	7535,25	7874,04
	DP	6,56	5,23	2,59	11,13	15,70	9,27	88,95	69,41	203,49	664,32	152,13	97,71
	CV (%)	6,10	4,58	2,49	5,36	7,19	4,80	1,64	1,21	3,59	7,64	2,02	1,24
	Exat. (%)	107,50	114,21	103,71	103,85	109,15	96,63	90,40	95,98	94,52	103,49	89,71	93,74
Reprod.	média	108,47			206,42			5595,60			8034,22		
	DP	6,50			15,59			197,41			623,44		
	CV (%)	5,99			7,55			3,53			7,76		
	Exat. (%)	108,47			103,21			93,26			95,65		

b = considerando a soma das frações constituintes da polimixina E

4.3.2.5 Linearidade

Os resultados obtidos na análise da linearidade do método ($CV \pm 20\%$ para LIQ e $\pm 15\%$ para demais controles) estão descritos nas tabelas 21, 22. A tabela 23 mostra as médias dos coeficientes angular, linear e de correlação obtidos nas triplicatas de curvas de calibração de polimixina B e colistina. O método foi considerado linear por estar dentro das especificações. As figuras 8 e 9 mostram as curvas de calibração da polimixina B e colistina.

Tabela 21: Linearidade da Polimixina B

Concentração nominal (ng/mL) ^a	Concentração experimental (ng/mL) ^a	Proporção		Polimixina B1			Polimixina B2		
		Polimixina B1 (76,4 ng/mL)	Polimixina B2 (23,6 ng/mL)	Média	DP	CV (%)	Média	DP	CV (%)
100	93,94	71,77	22,17	72,21	0,98	1,35	22,30	0,30	1,35
	95,98	73,33	22,65						
	93,62	71,53	22,09						
1500	1457,58	1113,59	343,99	1086,73	29,91	2,75	335,69	9,24	2,75
	1380,22	1054,49	325,73						
	1429,46	1092,11	337,35						
3000	3267,01	2495,99	771,01	2441,13	110,42	4,52	754,07	34,11	4,52
	3028,83	2314,03	714,80						
	3289,76	2513,38	776,38						
4500	4776,63	3649,34	1127,28	3579,66	88,96	2,49	1105,76	27,48	2,49
	4725,38	3610,19	1115,19						
	4554,26	3479,45	1074,80						
6000	6262,92	4784,87	1478,05	4729,54	127,28	2,69	1460,96	39,32	2,69
	6308,63	4819,79	1488,84						
	5999,94	4583,96	1415,99						
7500	7573,07	5785,83	1787,25	5531,10	327,75	5,93	1708,56	101,24	5,93
	7390,22	5646,13	1744,09						
	6755,68	5161,34	1594,34						
9000	9243,27	7061,85	2181,41	6963,34	129,49	1,86	2150,98	40,00	1,86
	9177,34	7011,49	2165,85						
	8922,34	6816,67	2105,67						
10500	9961,59	7610,66	2350,94	7707,07	162,75	2,11	2380,72	50,27	2,11
	9968,03	7615,57	2352,45						
	10333,73	7894,97	2438,76						

a = considerando a soma das frações constituintes de polimixina B

Tabela 22: Linearidade da Colistina (polimixina E)

Concentração nominal (ng/mL) ^b	Concentração experimental (ng/mL) ^b	Proporção		Colistina A			Colistina B		
		E1 (Colistina A) (17,9ng/mL)	E2 (Colistina B) (82,1ng/mL)	Média	DP	CV (%)	Média	DP	CV (%)
100	110,82	19,84	90,98	18,49	1,19	6,46	84,81	5,48	6,46
	98,10	17,56	80,54						
	100,98	18,07	82,90						
1500	1513,16	270,86	1242,30	270,14	4,90	1,81	1239,03	22,45	1,81
	1534,31	274,64	1259,67						
	1480,05	264,93	1215,12						
3000	2759,97	494,03	2265,94	519,41	22,83	4,40	2382,33	104,70	4,40
	3007,14	538,28	2468,86						
	2938,10	525,92	2412,18						
4500	5076,87	908,76	4168,11	904,34	15,91	1,76	4147,82	72,96	1,76
	4953,54	886,68	4066,85						
	5126,05	917,56	4208,48						
6000	5459,03	977,17	4481,86	1013,64	31,78	3,14	4649,15	145,77	3,14
	5784,24	1035,38	4748,86						
	5745,12	1028,38	4716,74						
7500	7022,94	1257,11	5765,83	1254,18	3,20	0,26	5752,42	14,67	0,26
	7009,34	1254,67	5754,67						
	6987,52	1250,77	5736,75						
9000	8923,64	1597,33	7326,31	1561,40	35,54	2,28	7161,52	163,03	2,28
	8718,57	1560,62	7157,94						
	8526,56	1526,25	7000,31						
10500	10739,10	1922,30	8816,80	1923,55	48,38	2,52	8822,56	221,90	2,52
	11019,83	1972,55	9047,28						
	10479,40	1875,81	8603,59						

b = considerando a soma das frações constituintes de colistina

Tabela 23: Médias dos coeficientes angular, linear e de correlação das curvas de calibração da polimixina B e Colistina (polimixina E)

Curva de calibração ^c			
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i> ²
Polimixina B	0,9739 ± 0,0074	98,1173 ± 40,7727	0,9946 ± 0 0003
Polimixina E	0,9856 ± 0,0198	8,7628 ± 9,2153	0,9908 ± 0,0007

c = os valores são a média ± DP (n=3)

Figura 8: Curva de calibração da Polimixina B

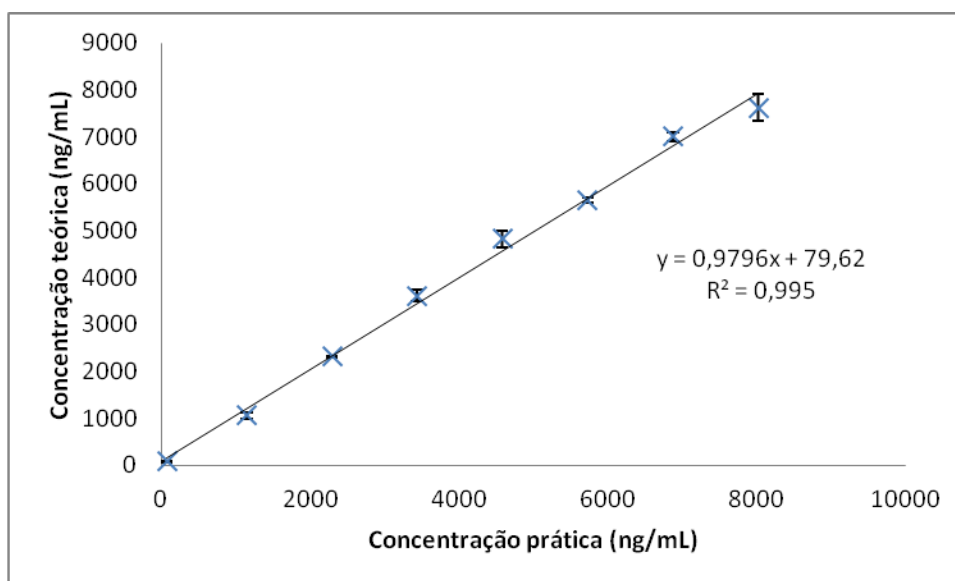
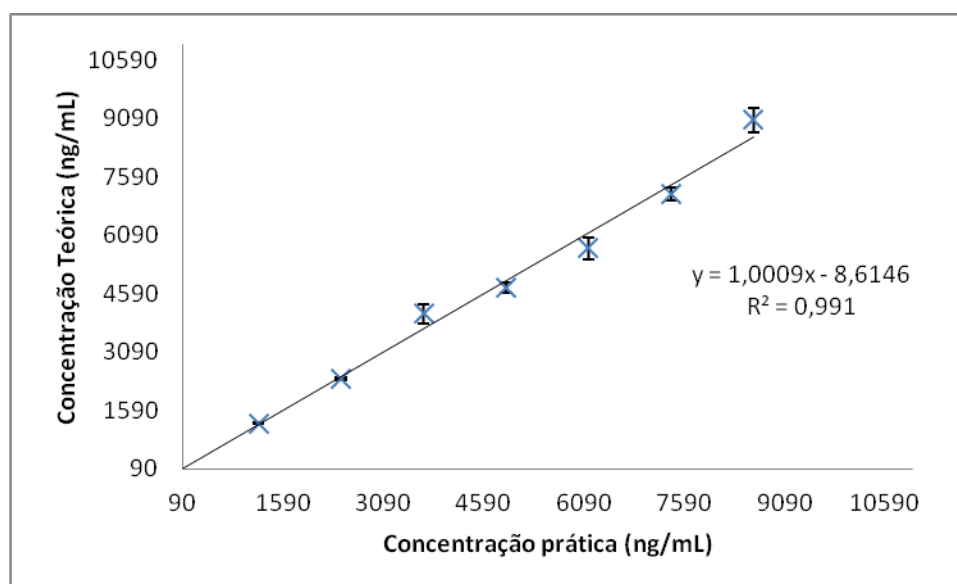


Figura 9: Curva de calibração da Colistina



4.3.2.6 Estabilidade de solução estoque para preparo dos padrões de calibração e controles de qualidade

Os resultados obtidos mostram que as soluções foram consideradas estáveis, pois não foi observado desvio superior a 10% (dez por cento) de suas respostas em comparação com as respostas das soluções recém-preparadas. Além da degradação para todas as frações dos analitos analisados não ultrapassar o limite de $\pm 15\%$ determinados nos critérios de aceitação, estando, portanto aprovados dentro das

condições analisadas. Estas condições aplicaram-se as duas polimixinas e PI. As tabelas 24, 25 e 26 mostram os resultados obtidos avaliando-se as concentrações referentes ao CQB (200ng/mL) e CQA (8400ng/mL) para as polimixinas e as áreas correspondentes à concentração de 1000ng para o PI .

Tabela 24: Percentual de degradação da polimixina B (considerando a soma das frações constituintes) nas soluções estoque para preparo de padrões de calibração e controles de qualidade após 5 e 8 dias de armazenamento das soluções estoque em geladeira (2 a 8°C).

Amostra	Referência		Geladeira - 5 dias		Geladeira - 8 dias	
	CQB (200ng/mL)	CQA (8400ng/mL)	CQB (200ng/mL)	CQA (8400ng/mL)	CQB (200ng/mL)	CQA (8400ng/mL)
1	214,61	8551,55	220,59	8140,61	197,50	7829,71
2	206,20	8895,27	221,87	9014,37	179,73	7753,04
3	222,08	8794,33	204,37	8034,21	188,86	7316,85
4	226,66	9364,54	205,60	8278,06	181,90	7762,42
5	215,25	8562,69	202,55	7904,28	183,74	7402,98
média	216,96	8833,68	211,00	8274,31	186,34	7613,00
DP	7,82	331,73	9,42	435,93	7,09	234,90
CV	3,60	3,76	4,46	5,27	3,81	3,09
Degradação (%)			-2,75	-6,33	-14,11	-13,82

Tabela 25: Percentual de degradação de Colistina (polimixina E) (considerando a soma das frações constituintes) nas soluções estoque para preparo de curvas e controles após 5 e 8 dias de armazenamento das em geladeira (2 a 8°C).

Amostra	Referência		Geladeira - 5 dias		Geladeira - 8 dias	
	CQB (200ng/mL)	CQA (8400ng/mL)	CQB (200ng/mL)	CQA (8400ng/mL)	CQB (200ng/mL)	CQA (8400ng/mL)
1	194,96	7773,92	196,44	7886,14	176,86	7956,41
2	180,72	7828,83	195,70	7498,31	168,09	7744,45
3	187,05	8058,17	188,69	7973,26	148,42	7985,33
4	195,18	7671,91	173,20	7589,73	149,66	7851,38
5	196,12	8138,78	188,26	8040,75	179,60	7832,65
média	190,81	7894,32	188,46	7797,64	164,52	7874,04
DP	6,72	196,76	9,34	240,10	14,77	97,71
CV	3,52	2,49	4,96	3,08	8,98	1,24
Degradação (%)			-1,23	-1,22	-13,77	-0,26

Tabela 26: Percentual de degradação do padrão interno (leucina encefalina) após 5 e 8 dias de armazenamento das soluções estoque em geladeira (2 a 8°C).

Amostra	Referência		Curva - geladeira - 5 dias		Curva - geladeira - 8 dias	
	CQB (200ng/mL)	CQA (8400ng/mL)	CQB (200ng/mL)	CQA (8400ng/mL)	CQB (200ng/mL)	CQA (8400ng/mL)
1	7124,066	7754,229	7966,952	8126,821	7529,053	7225,308
2	7391,581	7788,806	7518,698	7977,111	7065,346	7846,586
3	6969,776	7676,228	7939,348	8345,049	7863,746	7399,893
4	7627,418	7981,44	7584,647	7653,352	7343,583	7478,972
5	7071,107	7545,654	7777,760	8194,549	8210,637	7215,061
média	7236,79	7749,27	7757,48	8059,38	7602,47	7433,16
DP	268,33	159,91	202,64	262,70	446,95	257,34
CV (%)	3,71	2,06	2,61	3,26	5,88	3,46
Degradação (%)			7,20	4,00	5,05	-4,08

4.3.2.7 Estabilidade de solução estoque de polimixina B para realização dos experimentos de microbiologia

Os resultados obtidos mostram que as soluções foram consideradas estáveis, pois não foi observado desvio superior a 10% (dez por cento) de suas respostas em comparação com as respostas das soluções recém-preparadas. Além da degradação para todas as frações dos analitos analisados não ultrapassar o limite de +/- 15% determinados nos critérios de aceitação, estando, portanto aprovados dentro das condições analisadas. A tabela 27 mostra os resultados obtidos avaliando-se as concentrações referentes ao CQB (200ng/mL) e CQA (8400ng/mL).

Tabela 27: Percentual de degradação de polimixina B nas soluções estoque para realização dos experimentos de microbiologia após 5 e 8 dias de armazenamento das soluções estoque em geladeira (2 a 8°C) e freezer (-20°C).

	Referência		Geladeira - 5 dias		Freezer- 5 dias		Geladeira - 8 dias		Freezer- 8 dias	
	CQB*	CQA*	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA
Conc. 1	214,61	8551,55	194,53	7748,87	222,08	7624,71	225,66	7524,06	192,31	8122,70
Conc. 2	206,20	8895,27	195,20	7904,28	221,96	7944,54	176,56	7535,53	198,05	8190,96
Conc. 3	222,08	8794,33	184,67	7777,62	180,14	7310,98	201,58	7524,29	180,03	8432,16
Conc. 4	226,66	9364,54	181,61	7634,19	171,20	7736,06	186,06	7520,61	178,44	8340,48
Conc. 5	215,25	8562,69	186,06	7718,18	202,55	7694,01	173,51	7596,29	177,61	7728,02
média	216,96	8833,68	188,42	7756,63	199,59	7662,06	192,67	7540,16	185,28	8162,86
DP	7,82	331,73	6,11	98,45	23,45	229,64	21,44	31,88	9,30	271,83
CV	3,60	3,76	3,24	1,27	11,75	3,00	11,13	0,42	5,02	3,33
Degradação (%)			-13,16	-12,19	-8,01	-13,26	-11,19	-14,64	-14,60	-7,59

*CQB = 200ng/mL e CQA = 8400ng/mL

Em paralelo à análise da estabilidade dos analitos em solução, a análise das proporções das frações constituintes foi realizada com o objetivo de verificar se a degradação ocorreu de maneira proporcional para as frações como o ocorrido na recuperação. As proporções encontradas nas frações constituintes de ambas as polimixinas encontram-se nas tabelas 28,29, 30 e 31 e mostram que a degradação ocorreu de forma proporcional.

Tabela 28: Proporção das frações B1 e B2 da polimixina B nas soluções estoque para preparo de curvas e controles após 5 dias de armazenamento das soluções estoque em geladeira (2 a 8°C).

	Geladeira - 5 dias					
	CQB			CQA		
	B1	B2	SOMA	B1	B2	SOMA
Área 1	2480	616	3096	86990	22435	109425
Área 2	2808	703	3511	84844	25403	110247
Área 3	2599	678	3277	65602	19283	84885
Área 4	2452	670	3122	65658	19724	85382
Área 5	3371	650	4021	67439	19379	86818
média	2742	663,4	3405,4	74106,6	21244,8	95351,4
DP	378,55	32,60	381,66	10833,26	2662,23	13244,80
CV (%)	13,81	4,91	11,21	14,62	12,53	13,89
Proporção (%)	80,52	19,48		77,72	22,28	

Tabela 29: Proporção das frações B1 e B2 da polimixina B nas soluções estoque para preparo de curvas e controles após 8 dias de armazenamento das soluções estoque em geladeira (2 a 8°C).

	Geladeira - 8 dias					
	CQB			CQA		
	B1	B2	SOMA	B1	B2	SOMA
Área.1	2321	686	3007	57792	17257	75049
Área. 2	2823	631	3454	60166	17808	77974
Área. 3	2873	594	3467	58767	17611	76378
Área. 4	2452	670	3122	59760	17860	77620
Área 5	2946	597	3543	60373	18079	78452
média	2683	635,6	3318,6	59371,6	17723	77094,6
DP	278,06	41,73	237,94	1077,66	309,20	1377,49
CV (%)	10,36	6,57	7,17	1,82	1,74	1,79
Proporção (%)	80,85	19,15		77,01	22,99	

Tabela 30: Proporção das frações A e B da colistina (polimixina E) nas soluções estoque para preparo de curvas e controles após 5 dias de armazenamento das soluções estoque em geladeira (2 a 8°C).

	Geladeira - 5 dias					
	CQB			CQA		
	A	B	SOMA	A	B	SOMA
Área.1	368	1918	2286	19316	77747	97063
Área. 2	406	1825	2231	18446	78646	97092
Área. 3	374	1801	2175	19334	79782	99116
Área. 4	347	2134	2134	19133	78973	98106
Área 5	406	1825	2231	19166	79210	98376
média	380,2	1900,6	2211,4	19079	78871,6	97950,6
DP	25,60	137,96	58,41	364,82	753,20	878,68
CV (%)	6,73	7,26	2,64	1,91	0,95	0,90
Proporção (%)	17,19	85,95		19,48	80,52	

Tabela 31: Proporção das frações A e B da colistina (polimixina E) nas soluções estoque para preparo de curvas e controles após 8 dias de armazenamento das soluções estoque em geladeira (2 a 8°C).

	Geladeira - 8 dias					
	CQB			CQA		
	A	B	SOMA	A	B	SOMA
Área.1	375	1599	1974	19457	79135	98592
Área. 2	346	1429	1775	18039	77394	95433
Área. 3	274	1370	1644	19189	79505	98694
Área. 4	297	1281	1578	18447	77350	95797
Área 5	312	1525	1837	19316	77747	97063
média	320,8	1440,8	1761,6	18889,6	78226,2	97115,8
DP	40,02	125,30	156,94	614,98	1018,72	1520,17
CV (%)	12,48	8,70	8,91	3,26	1,30	1,57
Proporção (%)	18,21	81,79		19,45	80,55	

4.3.2.8 Estabilidade pós-processo

Os resultados obtidos mostram que os analitos apresentam estabilidade na mistura meio de cultura:plasma após extração e armazenamento no auto-injetor do equipamento à temperatura de 25°C, pois não foi observado desvio superior a 10% (dez por cento) de suas respostas em comparação com as respostas das soluções recém-

preparadas (referência). Além da degradação para todas as frações dos analitos analisados não ultrapassar o limite de $\pm 15\%$ determinados nos critérios de aceitação, estando, portanto aprovados dentro das condições analisadas. A tabela 32 mostra os resultados obtidos avaliando-se as concentrações referentes ao CQB (200ng/mL) e CQA (8400ng/mL). Como mostrado nos itens 4.3.2.3 e 4.3.2.6 sobre a recuperação e degradação das frações constituintes das polimixinas, a tabela 32 que representa a polimixina B (B1 + B2) e tabela 33 que representa a Colistina (polimixina E) (A + B), resume com segurança, o que acontece em cada fração.

Tabela 32: Percentual de degradação da polimixina B (B1+B2) após 24h de armazenamento das amostras extraídas a 25°C no auto-injetor.

Polimixina B				
	Referência		24h	
	CQB (200ng/mL)	CQA (8400ng/mL)	CQB (200ng/mL)	CQA (8400ng/mL)
Conc.1	214,606	8551,548	222,078	8220,694
Conc. 2	206,195	8895,267	221,964	7427,253
Conc. 3	222,078	8794,331	180,143	8119,902
Conc. 4	226,659	9364,542	171,196	8233,774
Conc. 5	215,249	8562,689	202,550	7934,599
média	216,96	8833,68	199,59	7987,24
DP	7,82	331,73	23,45	335,13
CV	3,60	3,76	11,75	4,20
degradação (%)			-8,01	-9,58

Tabela 33: Percentual de degradação da Colistina (polimixina E) (A + B) após 24h de armazenamento das amostras extraídas a 25°C no auto-injetor.

Colistina				
	Referência		24h	
	CQB (200ng/mL)	CQA (8400ng/mL)	CQB (200ng/mL)	CQA (8400ng/mL)
Conc. 1	227,304	9079,883	223,925	7985,329
Conc. 2	222,226	9131,707	207,726	7851,378
Conc. 3	207,726	8344,895	225,668	7832,652
Conc. 4	209,648	9482,091	206,778	7533,575
Conc. 5	214,387	9345,020	205,57	7502,621
média	216,26	9076,72	213,93	7741,11
DP	8,33	440,15	9,97	212,21
CV	3,85	4,85	4,66	2,74
degradação (%)			-1,08	-14,71

4.3.2.9 Proporção das frações constituintes da polimixina B e colistina (polimixina E) no medicamento Sulfato de polimixina B 500.00UI, Eurofarma, adicionado ao meio de cultura.

A semelhança entre as moléculas de polimixina B e colistina (polimixina E), descrita na introdução deste capítulo, levantou alguns questionamentos acerca da composição do medicamento. O medicamento avaliado foi sulfato de polimixina B, mas uma das dúvidas foi a possibilidade de haver colistina (polimixina E) no medicamento. Para a determinação da proporção das frações constituintes, o medicamento foi extraído e analisado de acordo com método validado e descrito anteriormente (item 4.3.2). A proporção das frações constituintes foi calculada como descrito no item 4.3.2.1.

Os resultados (tabela 31) mostram a proporção das frações B1 e B2 no medicamento Sulfato de polimixina B utilizado neste trabalho, além de uma pequena proporção de colistina (polimixina E). A soma das proporções de polimixinas representam 100% na formulação.

Tabela 34: Proporção das frações constituintes da polimixina B e polimixina E encontradas no medicamento.

	Polimixina B1	Polimixina B2	Polimixina E1 (Colistina A)	Polimixina E2 (Colistina B)	Soma das áreas
Área 1	72763	14895	109	989	88756
Área 2	73570	15040	98	844	89552
Área 3	72507	14727	103	935	88272
Área 4	73072	14840	94	857	88863
Área 5	72904	14631	103	834	88472
Média	72963,2	14826,6	101,4	891,8	88783
Proporção das frações (%)	82,181	16,700	0,114	1,004	

4.4 CONCLUSÃO

Diante dos resultados expostos, foi possível verificar que o método desenvolvido e validado, mostrou-se eficiente no que se propôs a quantificar as frações constituintes da polimixina B e Colistina (polimixina E) no medicamento Sulfato de polimixina B injetável adicionado ao meio de cultura utilizando um método de extração simples. O método permite a quantificação das quatro frações simultaneamente, de forma segura precisa e exata.

4.5 REFERÊNCIAS

BERGEN, P.J.; LI, J.; RAYNER, C.R.; NATION, R.L. Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemother** 2006;50: 1953–8.

BERGEN, J.P.; LANDERSDORFER, C.B.; ZHANG, J.; ZHAO, M.; LEE, H.J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of old polymyxins: what is new? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 2012.74: 213- 223

BERLANA, D.; LLOP, J.M.; FORT, E.; BADIA, M.B.; JODAR, R. Use of colistin in the treatment of multiple drug resistant Gram-negative infections. **American Journal of Health-System Pharmacy** 2005.62: 39-47.

CARLOS HENRIQUE CEZIMBRA KVITKO. Dissertação: Eficácia da polimixina B no tratamento de bacteremias por *Pseudomonas aeruginosa*. 2010. 80 pág. Ciências Médicas. Faculdade de Medicina. Universidade federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, BR- RS.

DECOLIN, D.; LEROY, P.; NICOLAS, A.; ARCHIMBAULT, P. Hyphenated liquid chromatographic method for the determination of colistin residues in bovine tissues. **Journal of Chromatography Science** 1997;35:557–64.

FALAGAS, M.E.; KASAIKOU, S.K. Toxicity of polymyxins: A systematic review of the evidence from old and recent studies. **Critical Care**. 2006; 10: R27.

GRÉGORIE, N.; GOBIN, P.; GRIGNON, C.; FRASCA, D.; SAULNIER, P.; COUET, W.; MIMOZ, O. Pharmacokinetic modelling of colistin methanesulfonate (CMS) and colistin in healthy volunteers after intravenous infusion. Annual Interscience Conference on **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**[ICAAC], 2008.

GOBIN. P.; LEMAITRE, F.; MARCHAND, S.; COUET, W.; OLIVIER, J.C. Assay of colistin and colistin methanesulfonate in plasma and urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Antimicrobial Agents Chemother** 2010; 54: 1941–1948.

JANSSON, B.; KARVANEN, M.; CARS, O.; PLACHOURAS, D.; FRIBERG, L.E. Quantitative analysis of colistin A and colistin B in plasma and culture medium using a simple precipitation step followed by LC/MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 2008;49:760–7.

LI, J.; RAYNER, C.R; NATION, R.L.; OWEN, R.J.; SPELMAN, D.; TAM, K.E.; LIOLIOS, L. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents Chemother**. 2006; 50: 2946-50.

LI, J., NATION, R. L.; TURNIDGE, J. D.; MILNE, R. W.; COULTHARD, K.; RAYNER, C. R.; PATERSON, D. L. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. **Lancet Infectious Diseases** 2006; 6:589–601

MA, Z.; WANG, J.; GERBER, J.P.; MILNE, R.W. Determination of colistin in human plasma, urine and other biological samples using LC-MS/MS. *Journal of chromatography B*. 2008. 862: 205-212.

MICHALOPOULOS, A.; KASIAKOU, S. K.; MASTORA, Z.; RELLOS, K.; KAPASKELIS A. M.; FALAGAS, M. E. Aerosolized colistin for the treatment of nosocomial pneumonia due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis. **Critical Care** 2005; 9:R53–R59.

MICHALOPOULOS, A.; FOTAKIS, D.; VIRTZILI, S.; VLETSAS, C.; RAFTOPOULOU, S.; MASTORA, Z.; FALAGAS, M. E. Aerosolized colistin as adjunctive treatment of ventilator-associated pneumonia due to multidrug-resistant

Gram-negative bacteria: a prospective study. **Respiratory. Medicine** 2008; 102:407–412.

NEIDE NATACHA FRANGO DE GOUVEIA. Dissertação: Desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação de aminas biogênicas em tunídeos. 2009. Universidade da Madeira, Funchal. Portugal.

PLACHOURAS, D.; KARVANEN, M.; FRIBERG, L. E.; PAPADOMICHELAKIS, E.; ANTONIADOU, A.; TSANGARIS, I.; KARAIKOS, I.; POULAKOU, G.; KONTOPIDOU, F.; ARMAGANIDIS, A.; CARS, O.; GIAMARELLOU, H.. Population pharmacokinetic analysis of colistin methanesulfonate and colistin after intravenous administration in critically ill patients with infections caused by Gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents Chemother** 2009; 53:3430–3436.

Resolução RDC N°27 de 17 de maio de 2012, ANVISA.

TAYLOR,P.J. Method development and optimization of LC-MS in Poletini A. Applications of LC-MS in toxicology. **Pharmaceutical Press**, 2006: 23-42p.

5 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

5. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

5.1 INTRODUÇÃO

O sucesso da terapia antimicrobiana é determinado pelo complexo de interações entre uma droga administrada num hospedeiro e um agente infeccioso. Em uma situação clínica, a complexidade dessas interações é geralmente refletida por uma grande variabilidade na relação dose-resposta. Portanto, para minimizar a variabilidade da dose-resposta, as principais características do fármaco, agente infectante e hospedeiro devem ser consideradas para a seleção do antibiótico e dose apropriados. Não fazer isso pode resultar em uma falha terapêutica ou surgimento de cepas resistentes (MULLER *et al*, 2004). Nesse sentido, as polimixinas são cada vez mais importantes devido ao aparecimento de micro-organismos Gram-negativos multidroga resistentes (MDR), tais como cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e enterobactérias produtoras de carbapenemases, suscetíveis a poucas drogas restantes (CHEN *et al*, 2011).

As formulações intravenosas de colistina e polimixina B foram usadas por aproximadamente duas décadas após sua descoberta, mas foram gradualmente abandonadas em 1970, devido a relatos de severos efeitos tóxicos (ROGER *et al* 1965; LAMB 1968; MELENEY *et al* 1961; FEKETTY *et al* 1962; ELWOOD *et al* 1966; BROWN *et al* 1970; PARISI *et al* 1965). Porém, continuaram a ser utilizadas em soluções oftálmicas e tópicas por décadas (ELIAS 2010). Entretanto, nos últimos anos, a administração endovenosa de colistina ficou restrita a infecções do trato respiratório causadas por patógenos Gram-negativos multirresistentes em pacientes com fibrose cística (VALERIUS *et al* 1991; FRIIS *et al* 1979; LEDSON *et al* 1998).

O mecanismo detalhado da atividade da polimixina não é claro. Esta atividade envolve uma interação polar inicial do lipopeptídeo catiônico com lipídio A de lipopolissacarídeos (LPS) da membrana externa do micro-organismo Gram-negativo, deslocando cátions divalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}) dos grupos fosfato carregados negativamente de lipídio A (HANCOCK, 1997), seguida pela absorção através da membrana externa. (CLAUSELL *et al.*, 2007).

As doses de polimixina B e colistimetato de sódio utilizados na prática clínica estão demonstradas na tabela 35. Vale ressaltar, entretanto, que essas doses foram definidas a partir da experiência empírica no uso dessas drogas, não tendo nenhum embasamento em estudos farmacocinéticos (LI *et al* 2006; KWA *et al* 2008). O mesmo se pode dizer para as recomendações de ajuste de doses na perda da função renal ou nas

diversas modalidades de hemodiálise (ZAVASCKI *et al*, 2007; PLACHOURAS, *et al* 2009).

Tabela 35: Dosagem de polimixina B e Colistimetato de sódio

Colistimetato de sódio	Polimixina B
Para pacientes com $\leq 60\text{kg}$ e função renal normal:	Para adultos e crianças maiores de 2 anos e com função renal normal:
IV ou IM: 4 a 5 mg/kg/dia dividida em 3 doses	IV: 15.000 – 25.000 U/kg/dia divididas em 2 doses
Para pacientes com $> 60\text{kg}$ e função renal normal:	IM: 25.000 – 30.000 U/kg/dia divididas em 4 a 6 doses
IV ou IM: 240 a 480 mg/dia até 720 mg/dia dividida em 3 doses	Intratecal: 50.000 U diária por 3 a 4 dias, depois 50.000 U em dias alternados 1 vez ao dia por pelo menos 14 dias, após culturas do líquido negativas e/ou glicose normal.
Inalação:	
40mg (500.000 U) 12/12 horas se $\leq 40\text{kg}$	
80mg (1.000.000U) 12/12 horas se $> 40\text{kg}$	
Para infecções pulmonares recorrentes, a dose aerossol pode ser aumentada para 160mg (2 milhões U) a cada 8 horas.	
Intratecal/ intraventricular: 10mg	

Adaptado de ELIAS 2010

Estudos referentes à farmacocinética da polimixina B são necessários para conhecimento e otimização do uso, pois os relatos publicados a mais de 30 anos referem-se à administração intramuscular. A recomendação atual intravenosa da polimixina B ao paciente com função renal normal é de 1,5 – 2,5 mg/kg/dia dividida em

2 doses, administradas em 1 hora de infusão (BEDFORD LABORATORIES). Administração intravenosa por infusão contínua tem sido recomendada (EVANS *et al* 1999). Tem sido sugerido para pacientes com disfunção renal, doses ajustadas que incluem decréscimo de dose diária e administração em intervalos prolongados (PULASKI *et al* 1949). Um estudo recente determinou a concentração sérica de polimixina B1 (o maior constituinte do sulfato de polimixina B) em nove pacientes após uso endovenoso. A meia vida encontrada foi de 13h. Em outro estudo usando polimixina B, 0,5 – 1,2 mg/kg a cada 12 horas, em infusão de 60 minutos, atingiu-se concentração no plasma de 2,38 – 13,9µg/mL após dois dias de tratamento, obtendo no sangue proteína sérica alta (78,5% - 92,4%). Neste mesmo estudo, menos de 1% de polimixina B infundida foi recuperada inalterada na urina (ZAVASCKI *et al* 2008). Também se observou uma alta ligação protéica (>95%) e um volume de distribuição de aproximadamente 1,39 L/kg (ZAVASCKI *et al* 2008). O colistimetato de sódio é eliminado por via renal (aproximadamente 60% nas primeiras 24 horas), enquanto que a colistina e polimixina B são eliminadas por vias diferentes não totalmente conhecidas. Não há descrição de excreção biliar (ELIAS, 2010).

Embora a eficácia clínica e a segurança sejam os padrões para comparação de antimicrobianos, medidas farmacocinéticas e farmacodinâmicas têm sido empregadas com grande frequência. As medidas PK-PD são características dos fármacos e podem ser usadas para identificar o melhor agente terapêutico para uma indicação particular (EBERT 2004).

Os parâmetros farmacocinéticos de um fármaco definem a velocidade e a extensão de sua penetração na corrente circulatória e nos diversos sítios extravasculares, bem como a velocidade e a extensão da eliminação do mesmo. Estes parâmetros são determinados a partir da caracterização do perfil plasmático dos fármacos (TASSO 2008).

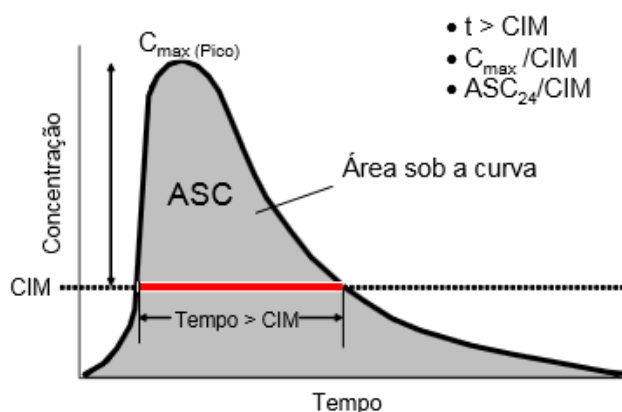
Os parâmetros farmacodinâmicos, por sua vez, definem a relação entre as concentrações dos fármacos e seus efeitos, os quais podem ser benéficos (terapêuticos) ou adversos (tóxicos). Os parâmetros farmacodinâmicos podem ser quantificados *in vivo*, embora eles sejam mais frequentemente medidos *in vitro* quando o fármaco em estudo for antimicrobiano. Nesse caso, a CIM (concentração inibitória mínima) e a CMB (concentração mínima bactericida) são os parâmetros mais comumente avaliados. A medida do efeito antimicrobiano mais difundida é a CIM. Segundo o CLSI, a CIM é a menor concentração que completamente inibe o crescimento visível do micro-

organismo, depois de um período de incubação a 37°C, de 18 a 24 h, com um inóculo padrão de aproximadamente 10^5 UFC/mL. Esta medida é usada extensivamente na prática clínica para determinar quais antimicrobianos podem ser usados para tratar uma infecção causada por um patógeno específico que tenha sido isolado (TASSO 2008). Pela combinação apropriada dos parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos de um antimicrobiano específico, uma aproximação da atividade do fármaco *in vivo* pode ser obtida (TASSO 2008).

Ainda em relação à CIM, é importante ressaltar, que os antibióticos são frequentemente divididos em dois grandes grupos: aqueles que são dependentes do tempo (concentração independente) e aqueles que são dependentes da concentração, que é o caso da polimixina B (CRAIG, 1996). A morte máxima foi vista ocorrer em concentrações de aproximadamente quatro a cinco vezes a CIM (NIGHTINGALE, 1980).

Vários índices PK-PD são utilizados para avaliar a eficácia clínica e microbiológica de uma agente antimicrobiano: o tempo acima da concentração inibitória mínima ($t > CIM$), a razão entre o pico de concentração do fármaco no plasma e a concentração inibitória mínima ($C_{\max}/CIM$) e a razão entre a área sob a curva e a concentração inibitória mínima (ASC/ CIM) (figura 10). Para os antimicrobianos tais como os β -lactâmicos e glicopetídeos, o $t > CIM$ é o índice PK-PD que melhor prediz os resultados clínicos. Em contraste, os aminoglicosídeos e fluorquinolonas exibem atividade bacteriana dependente da concentração, onde os índices que melhor se correlacionam com a eficácia são $(C_{\max}/CIM)$ e (ASC/ CIM) (TASSO 2008). Segundo Woodnut 2000, altos índices de $C_{\max}/CIM$ e ASC/ CIM provavelmente são necessários para prevenir a seleção de mutantes resistentes.

Figura 10: Índices farmacocinéticos/ farmacodinâmicos empregados na avaliação da eficácia dos antimicrobianos. (Adaptado de CRAIG, 1998).



Muitos estudos sobre a farmacodinâmica das polimixinas têm focado na colistina (LI *et al* 2005; LI *et al* 2006). Somente um deles examinou a farmacodinâmica relacionada à polimixina B (TAM *et al* 2005), que sugere que ASC/CIM seja o padrão farmacocinético/ farmacodinâmico (PK/PD) mais fortemente associado à atividade bactericida dessa droga. Em recente estudo experimental com a colistina, foi claramente demonstrada essa associação (DUDHANI *et al* 2010).

Embora alguns estudos sugiram que a polimixina B tenha efetividade no tratamento de infecções severas causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes, esta conclusão deve ser tomada com cautela devido à ausência de um grupo de controle e co-administração de outros antibióticos à maioria dos pacientes. Desconhece-se também se há diferença na eficácia clínica entre polimixina B e colistina (ZAVASCKI *et al*, 2007).

A ideia de comparar a exposição de um paciente a um antimicrobiano, por um período de 24 horas (ASC₂₄) e a CIM do micro-organismo infectante, para ajustar a dose e garantir que o melhor índice fosse encontrado para obter a melhor atividade possível, foi primeiramente proposta por Schentag e colaboradores no início dos anos 1990.

Segundo Mueller e colaboradores (2004), uma abordagem diferente para avaliar a eficácia de antibióticos é usar modelos de farmacocinética-farmacodinâmica com base nas *time-kill curves*. As *time-kill curves* podem mostrar o crescimento e morte microbiana em função do tempo e concentração do antibiótico. A concentração de antibiótico pode ser mantida constante ou inalterada para imitar um perfil de concentração *in vivo*, seja ou no plasma ou no local de infecção. Os resultados das *time-kill curves* podem ser analisados posteriormente, com as devidas modelagens matemáticas de farmacocinética e farmacodinâmicas. Finalmente esses modelos de farmacocinética e farmacodinâmicos ajudam a otimizar os regimes de dosagem com base em uma abordagem racional e científica.

A vantagem destes modelos *in vitro* é que eles permitem a comparação direta dos efeitos de várias concentrações e fornecem uma avaliação mais detalhada da relação farmacocinética/farmacodinâmica que o simples uso de CIMs.

O objetivo do estudo foi determinar a CIM (concentração inibitória mínima) da cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 frente ao padrão de sulfato de polimixina B e realizar o experimento de *time-kill curve* estática para observação do comportamento

(crescimento e morte) microbiano em função do tempo e de concentrações de antibiótico abaixo e acima da CIM.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado nos ensaios foi a cepa padrão Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 doado pelo Laboratório de Resistência Microbiana do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Pernambuco - ICB/UPE.

5.2.2 Antibiótico

Para os ensaios microbiológicos, foi utilizado o padrão de sulfato de polimixina B (8131 unidades de potência, USP).

5.2.3 Preparo das soluções

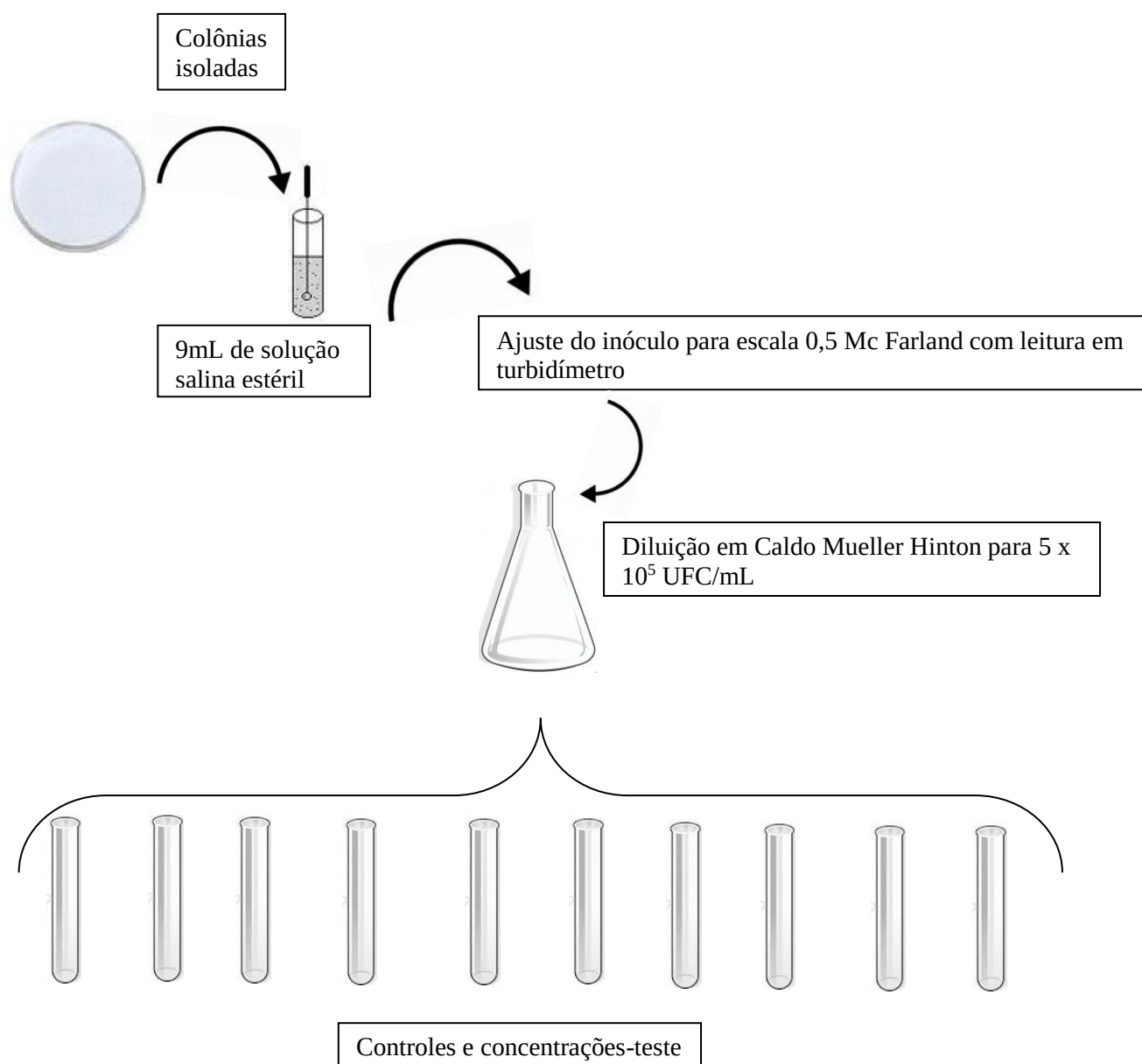
O preparo das soluções para os ensaios microbiológicos está descrito no capítulo 2, item 4.2.3, porém com a ressalva de que a solução mãe foi filtrada em filtro 0,22µm (Millipore) e tanto a solução mãe como as soluções de trabalho foram preparadas sob fluxo laminar e em água Milli-Q esterilizada. Para os ensaios, as soluções estoque foram guardadas a -20°C e utilizadas por, no máximo, 8 dias.

5.2.4 Determinação da CIM

A CIM foi determinada pelo método de macrodiluição (técnica onde se realizam diluições seriadas de antimicrobianos em um meio de cultura líquido, o qual permitirá o crescimento bacteriano). O inóculo foi preparado a partir de colônias incubadas a 37°C por um período de 18 à 20h em placas de ágar nutriente. As colônias foram suspensas em solução salina estéril para uma concentração equivalente a um valor de 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC / mL) e medido em um turbidímetro. A suspensão (0,2mL) foi inoculada em erlenmeyer contendo 59,8mL de caldo Mueller Hinton para se conseguir uma concentração final de 5×10^5 UFC / mL. Cerca de 2,5mL do inóculo foi colocado em uma série de tubos contendo a solução de antibiótico (2,5mL por tubo). A faixa de concentrações testada foi 0,3125µg/mL, 0,625µg/mL, 1,25µg/mL, 2,5µg/mL, 5,0µg/mL, 10,0µg/mL, 20,0µg/mL e 40,0µg/mL. Todos os tubos foram incubados a 37 ° C durante 24 h. O teste foi realizado em

triplicata. Os controles positivo (com bactéria, sem fármaco) e negativo (sem bactéria, sem fármaco) foram executados simultaneamente, a fim de avaliar o método. A figura 11 ilustra o experimento.

Figura 11: Esquema do experimento para determinação da CIM



O valor da CIM foi determinado como a concentração mais baixa do antibiótico que não permitiu a turvação do tubo após 24h de incubação. A porcentagem de morte das bactérias foi calculada de acordo com a fórmula descrita por Li *et al* (2008), onde 0,1mL da CIM e acima foram coletados e plaqueados em ágar Mueller Hinton. As

placas ficaram incubadas por 24h a 37°C e a redução do número de bactérias viáveis foi expresso em UFC/mL.

$$\% = \left(\frac{\text{Controle (UFC/mL)} - \text{antibiótico (UFC/mL)}}{\text{Controle (UFC/mL)}} \right) \times 100$$

5.2.5 Determinação do tempo da fase Log de crescimento microbiano

Para esta finalidade, o inóculo foi preparado conforme item 5.2.4. A suspensão (0,2mL) foi inoculada em erlenmeyer contendo 59,8mL de caldo Mueller Hinton para se conseguir uma concentração final de 5×10^5 UFC / mL. Por um período de 2 horas, a cada 20 min de incubação, 0,1mL da amostra era retirada e diluída em salina estéril, quando necessário. O tempo zero foi considerado o momento em que a suspensão de microorganismos foi adicionada ao caldo. A atividade antibacteriana foi medida como a redução do número de bactérias viáveis após 24 h de incubação, expressos como UFC / mL. O experimento foi feito em triplicata. Os controles positivo (com bactéria, sem fármaco) e negativo (sem bactérias, sem fármaco) foram executados simultaneamente, a fim de avaliar o método.

5.2.6 Time Kill Curves estáticas

Para a realização das *Kill curves* estáticas (concentrações de antibiótico constantes), o inóculo foi preparado como descrito no item 5.2.4. O caldo contendo uma concentração final de 5×10^5 UFC / mL em erlenmeyer foi incubado durante cerca de 2h a 37 ° C para permitir que as bactérias atingissem 1×10^6 UFC / mL, aproximadamente. Após 2 horas de incubação, 9mL de caldo foi distribuído em tubos e 1 mL de solução de polimixina B correspondente a uma série de concentrações constantes, 0,3125µg/mL, 0,625µg/mL, 1,25µg/mL, 2,5µg/mL, 5,0µg/mL, 10,0µg/mL, 20,0µg/mL e 40,0µg/mL foi adicionado. Essas concentrações representavam 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 e 8 vezes o valor da CIM. Cerca de 0,1mL de cultura foi coletado a partir do tempo zero e de hora em hora, perfazendo um total de 8 h de incubação. Diluições foram feitas em solução salina estéril quando necessário.

Após cada amostragem, para manter a concentração de antibiótico constante durante todo o ensaio simulando o *stead state*, (estado onde se mantém a concentração do antibiótico constante), o meio com antibiótico foi repostado no mesmo volume e com mesma concentração. O número de bactérias viáveis foi determinado por plaqueamento

de 0,1mL das diluições em placas de ágar Mueller Hinton. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h. A atividade antibacteriana foi medida como a redução do número de bactérias viáveis após 24 h de incubação e expressos como UFC/mL. O experimento foi feito em triplicata. Os controles positivo (com bactéria, sem fármaco) e negativo (sem bactérias, sem fármaco) foram executados simultaneamente.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Determinação da CIM

No CLSI não há referências de valores da CIM para a cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 frente à polimixina B. Para o experimento realizado, a CIM encontrada foi 2,5µg/mL e a tabela 36 mostra o percentual de morte das células.

Tabela 36: Percentagem de morte de bactérias frente à polimixina B

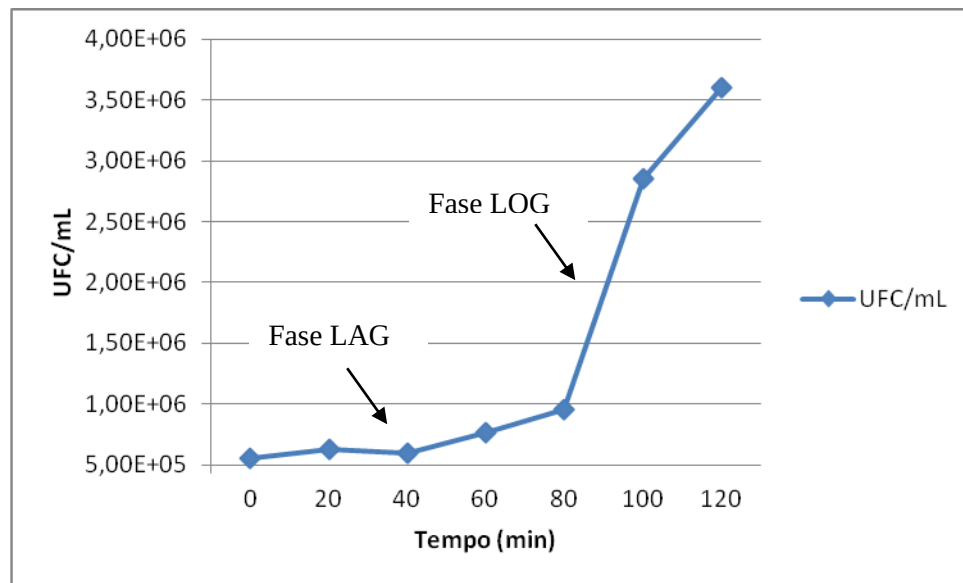
Concentração (µg/mL)	UFC/mL ^d	Morte (%) aprox.
0	$1,47 \times 10^{10} \pm 6,56 \times 10^8$	
2,5 (MIC)	$4,17 \times 10^5 \pm 7,64 \times 10^5$	99,99
5	$3,73 \times 10^4 \pm 2,52 \times 10^3$	99,99
10	$3,74 \times 10^2 \pm 4,56 \times 10^2$	99,99
20	$2,73 \times 10 \pm 7,51 \times 10$	99,99
40	0 ± 0	100,00

d = os valores são a média $\pm$ DP (n=3)

5.3.2 Determinação do tempo de fase Log do crescimento microbiano

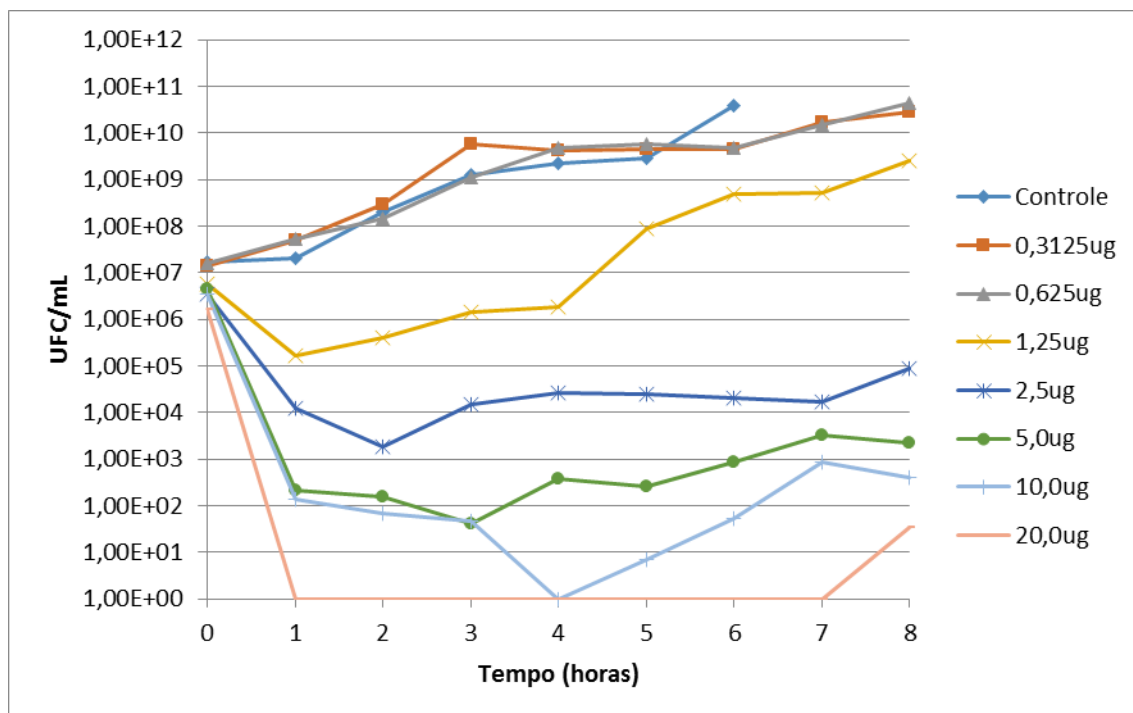
No ensaio para determinação do tempo necessário para alcance da fase Log de crescimento microbiano, foi possível observar que depois de 40 minutos de incubação a 37°C, a bactéria saiu da fase Lag. Sendo a fase Log, a fase onde há divisão celular, este procedimento foi importante para garantir que as bactérias estivessem na mesma fase de crescimento ao iniciar os experimentos de *Time kill curves*, ou seja, adaptadas ao ambiente e com o mesmo ritmo de divisão celular. A figura 12 mostra o resultado obtido.

Figura12: Determinação da fase Log



5.3.3 Time Kill Curves estáticas

A figura 13 mostra os resultados obtidos nos experimentos usando o modelo estático de *time-kill curves*.

Figura 13: Resultado do experimento de *Time kill curve* estática

Os resultados obtidos mostram importante relevância no que se refere à junção de ferramentas como a CIM, *time kill curves* e outras, fornecendo dados mais concisos para uma melhor adaptação posológica. Embora o MIC seja um indicador útil de potência da interação fármaco-micro-organismo, esta abordagem vista de modo isolado, não permite avaliar fatores importantes que influenciam na ação do fármaco como a ligação às proteínas e distribuição nos tecidos.

A ligação às proteínas é relevante porque apenas a droga que é desacoplada das proteínas do plasma será disponível para exercer um efeito farmacológico. A distribuição tecidual também deve ser considerada, uma vez que a maior parte das infecções não ocorrem no plasma, mas no interstício os tecidos. Esses dois fatores podem ser avaliados em modelos de *time kill curves*, mais precisamente os modelos dinâmicos.

Outro ponto importante a ressaltar é que, visto isoladamente, a CIM não fornece qualquer informação sobre a persistente atividade do agente antimicrobiano que continua na sequência exposição à droga (HOFFMAN *et al*, 1999). Uma desvantagem adicional e importante é que CIMs são convencionalmente medidas em concentrações de antibiótico constantes e, portanto, representam concentrações-limite.

Para Mueller e colaboradores (2004), as concentrações, logo abaixo da CIM podem mostrar alguma atividade anti-infecciosa e serem diferentes daqueles que estão próximos de zero. Da mesma forma, as concentrações um pouco acima do MIC não mostram o efeito máximo que só é alcançado com concentrações mais elevadas. Assim, as abordagens que contemplam apenas a CIM não reflete o cenário *in vivo*, em que as bactérias não são expostas a constantes concentrações.

O experimento de *kill curve* estática realizado neste trabalho ratifica que o CIM não é um parâmetro que deve ser avaliado isoladamente, a AUC/CIM torna-se um parâmetro importante para o ajuste de dose da polimixina B. Estudos em modelos dinâmicos de *kill curves* (onde a concentração varia em função do tempo) e o aporte de modelos matemáticos são necessários para um estudo mais completo de PK-PD da polimixina B a fim de identificar as melhores adaptações de doses, minimizando as resistências microbianas.

5.4 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, foi observado que o experimento de *time kill curve* realizado neste trabalho, descortinou em termos práticos, a importância da interação de conceitos para melhores esclarecimentos acerca de adaptação posológica da polimixina B.

5.5 REFERÊNCIAS

Bedford Laboratories. Polymyxin B for injections (package insert). Bedford, OH 44146. Bedford Laboratories; 2004.

BROWN, C.M.; DORMAN,D.C.; ROY, L.P. Acute renal failure due to overdosage of colistin. **Medical Journal of Australia**. 1970; 2: 923-4.

CHEN, L.F.; KAYE,D. Current Use for Old Antibacterial Agents: Polymyxins, Rifamycins, and Aminoglycosides. **Infectious Disease Clinics of North America**. 2011; 95: 819–842

CLAUSELL, A, GARCIA-SUBIRATS, PUJOL, M. M.; BUSQUETS, M.A, Rabanal F, Cajal Y. Gram-negative outer and inner membrane models: insertion of cyclic cationic lipopeptides. **J Phys Chem B** 2007;111:551–63.

CRAIG, W. A. Antimicrobial resistance issues of the future. **Diagnostics of Microbiology Infectious Diseases**. 1996; 25:213–217.

CRAIG, W. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antimicrobial dosing of mice and man. **Clinical Infectious Diseases**. 1998; 26: 1-12.

DUDHANI, R.V.; TURNIDGE, J.D.; COULTHARD, K.; MILNE, R.W.; RAYNER, C.R.; LI,J.; NATION, R.L. Elucidation of the pharmacokinetic/pharmacodynamic determinant of colistin activity against *Pseudomonas aeruginosa* in murine thigh and lung infection models. **Antimicrobial Agents Chemother**. 2010; 54: 1117-24.

EBERT, S.C. Application of pharmacokinetics and pharmacodynamics to antibiotic selection. **Pharmacy and Therapeutics Journal**. 2004; 4: 244-250.

ELWOOD, C.M.; LUCAS, G.D.; MUEHRCKE, R.C. Acute renal failure associated with sodium colistimethate treatment. **Archives of Internal Medicine**. 1966; 118: 326-34.

EVANS, M.E.; FEOLA, D.J.; RAPP, R.P. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant Gram-negative bacteria. **Annals of Pharmacotherapy**. 1999; 33: 960-7.

FEKETY JR, F.R.; NORMAN, P.S.; CLUFF, L.E. The treatment of gram-negative bacillary infections with colistin. The toxicity and efficacy of large doses in forty-eight patients. **Annals of Internal Medicine**. 1962; 57: 214-29.

FRIIS, B. Chemotherapy of chronic infections with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in lower airways of patients with cystic fibrosis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**. 1979; 11: 211-7.

HANCOCK R.E. Peptide antibiotics. **Lancet** 1997; 349:418-22

HOFFMAN, A.; STEPENSKY, D. Pharmacodynamic aspects of modes of drug administration for optimization of drug therapy. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst**. 1999;16:571-639.

KWA, A.L.; TAM, V.H.; FALAGAS, M.E. Polymyxins: a review of the current status including recent developments. *Annals of the Academy of Medicine Singapore*. 2008; 37: 870-83.

LAMB, R. Colistin sulfate in the treatment of specific bacterial intestinal infections. **Scottish Medical Journal**. 1968; 13: 9-12.

LAURA DA SILVA ELIAS. Dissertação: Fatores de risco associados à mortalidade de pacientes tratados com polimixina B endovenosa. 2010. 78 pág. Ciências Médicas. Faculdade de Medicina. Universidade federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, BR-RS.

LEANDRO TASSO. Tese: Modelagem farmacocinética-farmacodinâmica das fluoquinolonas levofloxacino e gatifloxacino. 2008. 115 pág. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, BR-RS.

LEDSON, M.J.; GALLAGHER, M.J.; COWPERTHWAIT, C.; CONVERY, R.P.; WALSHAW, M.J. Four years experiences of intravenous colomycin in na adult cystic fibrosis unit. **European Respiratory Journal**. 1998; 12: 592-4.

LI, J.; NATION, R.L.; MILNE, R.W.; TURNIDGE, J.D.; COUTHARD, K. Evaluation of colistin as an agent against multiresistant Gram-negative bacteria. **International Journal Antimicrobials Agents**. 2005; 25: 11-25.

LI, J., NATION, R. L.; TURNIDGE, J. D.; MILNE, R. W.; COULTHARD, K.; RAYNER, C. R.; PATERSON, D. L. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. **Lancet Infectious Diseases** 2006; 6:589-601

MELENEY, F.L.; PROUT JR, G.R. Some laboratory and clinical observations on colymycin (colistin) with particular reference to *Pseudomonas* infections. **The Journal of Surgery, gynecology and obstetrics**. 1961; 112: 211-7.

MULLER, M.; PEÑA, A.; DERENDORF, H. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves versus MIC. **Antimicrobial Agents Chemother**. 2004; 28:369–377.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically. 4th. ed. Approved Standard. NCCLS Publication No. M7–A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.

NIGHTINGALE, C.H.; MURAKAWA, T. Antimicrobial pharmacodynamics in theory and clinical practice. New York, Marcel Dekker, INC.; 2002.

PARISI, A.F.; KAPLAN, M.H. Apnea during treatment with sodium colistimethate. **JAMA Internal Medicine**. 1965; 194: 298-9.

PLACHOURAS, D.; KARVANEM, M.; FRIBERG, L.E.; PAPADOMICHELAKIS, E.; ANTONIADOU, A.; KARAIKOS, I.; POLAKOU, G.; KONTOPIDOU, F.; ARMAGANIDIS, A.; CARS, O.; GIAMARELLOU, H. Population pharmacokinetic analysis of colistin methanesulfonate and colistin after intravenous administration in critically ill patients with infections caused by Gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents Chemother**. 2009; 53: 3430-6.

PULASKI, E.J.; BAKER, H.J. Laboratory and clinical studies of polymyxin B and E. **Journal of Clinical Investigation**. 1949; 28: 1028-31.

RODGER, K.C.; NIXON, M.; TONNING, H.O. Treatment of infections with colistimethate sodium (colymycin). **Canadian Medical Association Journal**. 1965; 93: 143-6.

SHENTAG, J.J.; NIX, D.E.; ADELMAN, M.H. Mathematical examination of individualization principles (1): Relationships between AUC above MIC and area under the inhibitory curve for cefmenoxime, ciprofloxacin and tobramycin. *The Annals Pharmacotherapy*. 1991; 25: 1050-1057.

TAM, V.H.; SCHILLING, A.N.; VO, G.; KABBARA, S.; KWA, A.L.; WIEDEHOLD, N.P.; LEWIS, R.E. Pharmacodynamics of Polymyxin B against *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemother**. 2005; 49: 3624-30.

VALERIUS, N.H.; KOCH, C.; HOIBY, N. Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in cystic fibrosis by early treatment. **Lancet Infectious Diseases**. 1991; 338: 725-6.

WOODNUT, G. Pharmacodynamic to combat resistance. **Journal Antimicrobials Chemother**. 2000; 46: 25 – 31.

ZAVASCKI, A.P.; GOLDANI, L.Z.; NATION, R.L. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. **Journal Antimicrobials Chemother.** 2007; 60: 1206 – 15.

ZAVASCKI, A.P.; GOLDANI, L.Z.; CAO, G.; SUPERTI, S.V.; LUTZ, L.; BARTH, A.L.; RAMOS, F.; BONIATTI, M.M.; NATIO, R.L.; LI, J. Pharmacokinetics of intravenous polymyxin B in critically ill patients. **Clinical Infectious Diseases.** 2008; 47: 1298-304.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

O método desenvolvido e validado mostrou-se preciso, exato e reprodutível para a quantificação das frações constituintes das polimixinas no medicamento injetável adicionado ao meio de cultura.

Os ensaios microbiológicos (determinação da CIM e tempo para alcance da fase Log de crescimento microbiano) realizados para assegurar os resultados de *Time kill curves* descritas neste trabalho, mostraram-se satisfatórios.

O experimento de *Time kill curve* estática realizado confirmou as informações descritas na literatura e a modelagem matemática se faz necessária para complementar as informações visando uma melhor avaliação da farmacocinética e farmacodinâmica da polimixina B frente à *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Bedford Laboratories. Polymyxin B for injections (package insert). Bedford, OH 44146. Bedford Laboratories; 2004.

BERGEN, P.J.; LI, J.; RAYNER, C.R.; NATION, R.L. Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemother** 2006;50: 1953–8.

BERGEN, P.J.; LI, J.; NATION, R.J. Comparison of once-, twice- and thrice-daily dosing of colistin on antibacterial effect and emergence of resistance: studies with *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro pharmacodynamics model. **Journal Antimicrobials Chemother**. 2008; 61: 636-642.

BERGEN, J.P.; LANDERSDORFER, C.B.; ZHANG, J.; ZHAO, M.; LEE, H.J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of old polymyxins: what is new? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 2012.74: 213- 223

BERLANA, D.; LLOP, J.M.; FORT, E.; BADIA, M.B.; JODAR, R. Use of colistin in the treatment of multiple drug resistant Gram-negative infections. **American Journal of Health-System Pharmacy** 2005.62: 39-47.

BROWN, C.M.; DORMAN, D.C.; ROY, L.P. Acute renal failure due to overdosage of colistin. **Medical Journal of Australia**. 1970; 2: 923-4.

CARLOS HENRIQUE CEZIMBRA KVITKO. Dissertação: Eficácia da polimixina B no tratamento de bacteremias por *Pseudomonas aeruginosa*. 2010. 80 pág. Ciências Médicas. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, BR- RS.

CHEN, L.F.; KAYE, D. Current Use for Old Antibacterial Agents: Polymyxins, Rifamycins, and Aminoglycosides. **Infectious Disease Clinics of North America**. 2011; 95: 819–842

CLAUSELL, A, GARCIA-SUBIRATS, PUJOL, M. M.; BUSQUETS, M.A, Rabanal F, Cajal Y. Gram-negative outer and inner membrane models: insertion of cyclic cationic lipopeptides. **J Phys Chem B** 2007;111:551–63.

CRAIG, W. A. Antimicrobial resistance issues of the future. **Diagnostics of Microbiology Infectious Diseases**. 1996; 25:213–217.

CRAIG, W. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antimicrobial dosing of mice and man. **Clinical Infectious Diseases**. 1998; 26: 1-12.

DECOLIN, D.; LEROY, P.; NICOLAS, A.; ARCHIMBAULT, P. Hyphenated liquid chromatographic method for the determination of colistin residues in bovine tissues. **Journal of Chromatography Science** 1997;35:557–64.

DUDHANI, R.V.; TURNIDGE, J.D.; COULTHARD, K.; MILNE, R.W.; RAYNER, C.R.; LI, J.; NATION, R.L. Elucidation of the pharmacokinetic/pharmacodynamic

determinant of colistin activity against *Pseudomonas aeruginosa* in murine thigh and lung infection models. **Antimicrobial Agents Chemother.** 2010; 54: 1117-24.

EBERT, S.C. Application of pharmacokinetics and pharmacodynamics to antibiotic selection. **Pharmacy and Therapeutics Journal.** 2004; 4: 244-250.

ELWOOD, C.M.; LUCAS, G.D.; MUEHRCKE, R.C. Acute renal failure associated with sodium colistimethate treatment. **Archives of Internal Medicine.** 1966; 118: 326-34.

EVANS, M.E.; FEOLA, D.J.; RAPP, R.P. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant Gram-negative bacteria. **Annals of Pharmacotherapy.** 1999; 33: 960-7.

FALAGAS, M.E.; KASIAKOU, S.K.; TSIODRAS, S.; MICHALOPOULOS, A. The use of intravenous and aerolized polymyxins for the treatment of infections in critically ill patients: a review of the recent literature. **Clinical Medicine Research.** 2006; 4: 138-46.

FALAGAS, M.E.; KASIAKOU, S.K. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. **Critical Care.** 2006; 10:R27.

FALAGAS, M.E.; BLIZIOTIS, I.A. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? **International Journal Antimicrobial Agents.** 2007; 29: 630-6.

FALAGAS, M.E.; RAFAILIDIS, P.I.; MATTHAIIOU, D.K.; VIRTZILI, S.; NIKITA, D.; MICHALOPOULOS, A. Pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections: characteristics and outcome in a series of 28 patients. **International Journal Antimicrobial Agents.** 2008; 32: 450-4.

FALAGAS, M.E.; RAFAILIDIS, P.I. Nephrotoxicity of colistin: new insight into and old antibiotic. **Clinical Infectious Diseases.** 2009; 48: 1729-31.

FALAGAS, M.E.; RAFAILIDIS, P.I.; IOANNIDOU, E.; ALEXIOU, V.G.; MATTHAIIOU, D.K.; KARAGEORGOPOULOS, D.E.; KAPASKELIS, A.; NIKITA, D.; MICHALOPOULOS, A. Colistin therapy for microbiologically documented multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: a retrospective cohort study of 258 patients. **International Journal Antimicrobial Agents.** 2010; 35: 194-9.

FEKETTY JR, F.R.; NORMAN, P.S.; CLUFF, L.E. The treatment of gram-negative bacillary infections with colistin. The toxicity and efficacy of large doses in forty-eight patients. **Annals of Internal Medicine.** 1962; 57: 214-29.

FRIIS, B. Chemotherapy of chronic infections with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in lower airways of patients with cystic fibrosis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases.** 1979; 11: 211-7.

FURTADO, G.M.; D'AZEVEDO, P.A.; GALES, A.C.; PIGNATARI, A.C.; MEDEIROS, E.A. Intravenous polymyxin B for the treatment of nosocomial

pneumonia caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal Antimicrobials Agents**. 2007; 30: 315-9.

GALES, A.C; REIS, A.O.; JONES R.N. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. **Journal Clinical Microbiology** 2001; 39(1):183–90.

GOBIN. P.; LEMAITRE, F.; MARCHAND, S.; COUET, W.; OLIVIER, J.C. Assay of colistin and colistin methanesulfonate in plasma and urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Antimicrobial Agents Chemother** 2010; 54: 1941–1948.

GRÉGORIE, N.; GOBIN, P.; GRIGNON, C.; FRASCA, D.; SAULNIER, P.; COUET, W.; MIMOZ, O. Pharmacokinetic modelling of colistin methanesulfonate (CMS) and colistin in healthy volunteers after intravenous infusion. Annual Interscience Conference on **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**[ICAAC], 2008.

HANLON, G.W. The emergence of multidrug resistant *Acinetobacter* species: a major concern in the hospital setting. **Letters in Applied Microbiology**. 2005; 41: 375-8

HARTZELL, J.D.; NEFF, R.; AKE, J.; HOWARD, R.; OLSON, S.; PAOLINO, K.; VISHNEPOLSKY, M.; WEINTROB, A.; WORTMANN, G. Nephrotoxicity associated with intravenous colistin (colistimethate sodium) treatment at a tertiary care medical center. **Clinical Infectious Diseases**. 2009; 48: 1724-8.

HELFAND, M.S.; BONONO, R.A. Current challenges in antimicrobial chemotherapy: the impact of extended-spectrum beta-lactamases and metallo-beta-lactamases on the treatment of resistant Gram-negative pathogens. **Current Opinion Pharmacology**. 2005; 5:452-8.

HERMSEN, E.D.; SULLIVAN C.J.; ROTSCHAFER J.C. Polymyxins: pharmacology, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical applications. **Infectious Diseases Clinical North America** 2003;17 (3):545–62.

HOLLOWAY, K.P.; ROUPHAEL, N.G.; WELLS, J.B.; KING, M.D.; BLUMBERG, H.M. Polymyxin B and doxycycline use in patients with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in the intensive care unit. **Annals of pharmacotherapy**. 2006; 40: 1939-45.

HOOPER, J.JR.; JAWETZ, E.; HINMAN, F, JR. Polymyxin B in Chronic pyelonephritis: observations on the safety of the drug and on its influence on the renal infection. **American Journal Medicine Science**. 1953; 225: 402-9.

HANCOCK R.E. Peptide antibiotics. **Lancet** 1997; 349:418–22

HOFFMAN, A.; STEPENSKY, D. Pharmacodynamic aspects of modes of drug administration for optimization of drug therapy. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst**. 1999;16:571–639.

ITOKAZU, G.S.; QUINN, J.P.; BELL-DIXON, C.; KAHAN, F.M.; WEINSTEIN, R.A. Antimicrobial resistance rates among aerobic Gram-negative bacilli recovered from patients in intensive care units: evaluation of a national postmarketing surveillance program. **Clinical Infectious Diseases**. 1996; 23: 779-84.

JAIN, R.; DANZINGER, L.H. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: an emerging challenge to clinicians. **Annals of Pharmacotherapy**. 2004; 38: 1449-59.

JANSSON, B.; KARVANEN, M.; CARS, O.; PLACHOURAS, D.; FRIBERG, L.E. Quantitative analysis of colistin A and colistin B in plasma and culture medium using a simple precipitation step followed by LC/MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 2008;49:760–7.

JONES, R.N. Impact of changing pathogens and antimicrobial susceptibility patterns in the treatment of serious infections in hospitalized patients. **American Journal of Medicine**. 1996; 100: 3S-12S.

KANG, J.W.; SCHEPDAEL, V.A.; ORWA, J.A.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Analysis of polymyxin B sulfate by capillary electrophoresis with cyclodextrin as additive. Method development and validation. **Journal of Chromatography A**. 2000; 879: 211-8.

KASAIKOU, S.K.; MICHALOPOULOS, A.; SOTERIADES, E.S.; SAMONIS, G.; SERMAIDES, G.J.; FALAGAS, M.E. Combination therapy with intravenous colistin for management of infections due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis. **Antimicrobial Agents Chemother**. 2005; 49: 3136-46.

KONTOPIDOU, F.; ARMAGANIDIS, A.; CARS, O.; GIAMARELLOU, H.. Population pharmacokinetic analysis of colistin methanesulfonate and colistin after intravenous administration in critically ill patients with infections caused by Gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents Chemother** 2009; 53:3430–3436.

KUCERS, A. BENNETT, N.M. The use of antibiotics. A comprehensive review with clinical emphasis. 4th ed. Philadelphia: Lippincott; 1987: 905-17.

KUNIN, C.M. A guide to use of antibiotics in patients with renal disease. A table of recommended doses and factors governing serum levels. **Annals International of Medicine**. 1967; 67: 151-8.

KWA A, KASIAKOU S.K.; TAM V.H. Polymyxin B: similarities to and differences from colistin (polymyxin E). **Expert Review Antimicrobial Infections Therapy** 2007; 5(5): 811–21.

KWA, A.L.; TAM, V.H.; FALAGAS, M.E. Polymyxins: a review of the current status including recent developments. **Annals of the Academy of Medicine Singapore**. 2008; 37: 870-83.

LAMB, R. Colistin sulfate in the treatment of specific bacterial intestinal infections. **Scottish Medical Journal**. 1968; 13: 9-12.

LAURA DA SILVA ELIAS. Dissertação: Fatores de risco associados à mortalidade de pacientes tratados com polimixina B endovenosa. 2010. 78 pág. Ciências Médicas. Faculdade de Medicina. Universidade federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, BR-RS.

LEANDRO TASSO. Tese: Modelagem farmacocinética-farmacodinâmica das fluoquinolonas levofloxacino e gatifloxacino. 2008. 115 pág. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, BR- RS.

LEDSON, M.J.; GALLAGHER, M.J.; COWPERTHWAIT, C.; CONVERY, R.P.; WALSHAW, M.J. Four years experiences of intravenous colomycin in na adult cystic fibrosis unit. **European Respiratory Journal**. 1998; 12: 592-4.

LI, J.; NATION, R.L.; MILNE, R.W.; TURNIDGE, J.D.; COUTHARD, K. Evaluation of colistin as an agent against multiresistant Gram-negative bacteria. **International Journal Antimicrobials Agents**. 2005; 25: 11-25.

LI, J.; RAYNER, C.R; NATION, R.L.; OWEN, R.J.; SPELMAN, D.; TAM, K.E.; LIOLIOS, L. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents Chemother**. 2006; 50: 2946-50.

LI, J., NATION, R. L.; TURNIDGE, J. D.; MILNE, R. W.; COULTHARD, K.; RAYNER, C. R.; PATERSON, D. L. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. **Lancet Infectious Diseases** 2006; 6:589–601

LI, J.; NATION, R.L.; OWEN, R.J.; WONG, S.; SPELMAN, D.; FRANKLIN, C. Antibigrams of multidrug-resistant clinical *Acinetobacter baumannii*: promising therapeutic options for treatment of infection with colistin-resistant strains. **Clinical Infectious Diseases**. 2007; 45:594-8.

MA, Z.; WANG, J.; GERBER, J.P.; MILNE, R.W. Determination of colistin in human plasma, urine and other biological samples using LC-MS/MS. *Journal of chromatography B*. 2008. 862: 205-212.

MARKOU, N.; APOSTOLAKOS, H.; KOUMOUDI, C.; ATHANASIOU, M.; KOUTSOUKOU, A.; ALAMANOS, I.; GREGORAKOS, L.; Intravenous colistin in the treatment of sepsis from multiresistant Gram-negative bacilli in critically ill patients. **Critical Care**. 2003; 7: R78-83.

MCGOWAN, J.E. Resistance in nonfermenting Gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. **Antimicrobial Journal Infectious Control**. 2006; 34: S29-37.

MELONEY, F.L.; PROUT JR, G.R. Some laboratory and clinical observations on colymycin (colistin) with particular reference to *Pseudomonas* infections. **The Journal of Surgery, gynecology and obstetrics**. 1961; 112: 211-7.

MENDES, R.E.; FRITSCH, T.R.; SADER, H.S.; JONES, R.N. Increased antimicrobial susceptibility profiles among polymyxin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **Clinical Infectious Diseases**. 2008; 46: 1324-6.

MENDES, C.A.C.; BURDMANN, E.A. Polimixinas – revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**. 2009; 55(6): 752-9.

MICHALOPOULOS, A.; KASIAKOU, S. K.; MASTORA, Z.; RELLOS, K.; KAPASKELIS A. M.; FALAGAS, M. E. Aerosolized colistin for the treatment of nosocomial pneumonia due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis. **Critical Care** 2005; 9:R53–R59.

MICHALOPOULOS, A.; FOTAKIS, D.; VIRTZILI, S.; VLETSAS, C.; RAFTOPOULOU, S.; MASTORA, Z.; FALAGAS, M. E. Aerosolized colistin as adjunctive treatment of ventilator-associated pneumonia due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria: a prospective study. **Respiratory. Medicine** 2008; 102:407–412.

MICHALOPOULOS, A.S.; KARATZA, D.C. Multidrug-resistant gram-negative infections: the use of colistin. **Expert Review Antimicrobial Infections Therapy** 2010;8 (9):1009–17.

MORALES, A.P.; CALDAS, C. De volta à era pré – analítica: a busca emergencial por novos arcabouços. **Ciência e Cultura** [online] 2010; 62 (6): 14-16

MULLER, M.; PEÑA, A.; DERENDORF, H. Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves versus MIC. **Antimicrobial Agents Chemother**. 2004; 28:369–377.

NATION, L.; LI, J. Optimizing use of colistin and polymyxin B in the critically ill. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**. 2007; 28:604-614.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically. 4th. ed. Approved Standard. NCCLS Publication No. M7–A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.

NEIDE NATACHA FRANGO DE GOUVEIA. Dissertação: Desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação de amins biogênicas em tunídeos. 2009. Universidade da Madeira, Funchal. Portugal.

NIGHTINGALE, C.H.; MURAKAWA, T. Antimicrobial pharmacodynamics in theory and clinical practice. New York, Marcel Dekker, INC.; 2002.

OUDEKIRK, J.P.; NORD, J.A.; TURETT, G.S.; KISLAK, J.W. Polymyxin B nephrotoxicity and efficacy against nosocomial infectious caused Gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents Chemother**. 2003; 47: 2659-62.

OWEN, R.J.; LI, J.; NATION, R.L.; SPELMAN, D. In vitro pharmacodynamics of colistin against multiresistant Gram-negative bacteria. **Journal Antimicrobials Chemother.** 2007; 59: 473-7.

PARISI, A.F.; KAPLAN, M.H. Apnea during treatment with sodium colistimethate. **JAMA Internal Medicine.** 1965; 194: 298-9.

PLACHOURAS, D.; KARVANEN, M.; FRIBERG, L. E.; PAPADOMICHELAKIS, E.; ANTONIADOU, A.; TSANGARIS, I.; KARAIKOS, I.; POULAKOU, G.;

PAUL, M.; BISHARA, J.; LEVCOVICH, A.; CHOWERS, M.; GOLDBERG, E.; SINGER, P.; LEV, S.; LEON, P.; RASKIN, M.; YAHAV, D.; LEIBOVICI, L. Effectiveness and safety of colistin: prospective comparative cohort study. **Journal Antimicrobials Chemother.** 2010; 65: 1019-27.

PEDERSEN, M.F.; PEDERSEN, J.F.; ADESN, P.O. A clinical and experimental comparative study of sodium colistimethate and polymyxin B sulfate. **Investigative Urology.** 1971; 9: 234-7

PEREIRA, G.M.; MULLER, P.R.; LEVIN, A.S. Salvage treatment of pneumonia and initial treatment of tracheobronchitis caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli with inhaled Polymyxin B. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.** 2007; 58, 235-40.

PLACHOURAS, D.; KARVANEM, M.; FRIBERG, L.E.; PAPADOMICHELAKIS, E.; ANTONIADOU, A.; KARAIKOS, I.; POLAKOU, G.; KONTOPIDOU, F.; ARMAGANIDIS, A.; CARS, O.; GIAMARELLOU, H. Population pharmacokinetic analysis of colistin methanesulfonate and colistin after intravenous administration in critically ill patients with infections caused by Gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents Chemother.** 2009; 53: 3430-6.

PRICE, D.J.; GRAHAM, D.I. Effects of large doses of colistin sulphomethate sodium on renal function. **British Medical Journal.** 1970; 4: 525-7

PULASKI, E..J.; BAKER, H.J. Laboratory and clinical studies of polymyxin B and E. **Journal of Clinical Investigation.** 1949; 28: 1028-31.

RAMPHAL, R.; AMBROSE, P.G. Extended-spectrum beta-lactamases and clinical outcomes: current data. **Clinical Infectious Diseases.** 2006; 42: S164-72.

RATJEN, F.; RIETSCHER, E.; KASEL, D. Pharmacokinetics of inhaled colistin in patients with cystic fibrosis. **Journal Antimicrobials Chemother.** 2006; 57: 306 – 311.

Resolução RDC Nº27 de 17 de maio de 2012, ANVISA.

RODGER, K.C.; NIXON, M.; TONNING, H.O. Treatment of infections with colistimethate sodium (colymycin). **Canadian Medical Association Journal.** 1965; 93: 143-6.

ROSSI, Flávia; ANDREAZZI, Denise B. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma. São Paulo – SP. Editora Atheneu, 2005.

ROSSOLINI, G.M.; MANTEGOLI, E. Treatment and controlo f severe infections caused by multirresistent *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Microbiology Infectious**. 2005; 11: 17-32.

SADER, H.S.; MENDES, C. F.; PIGNATARI, A.C.; PFALLER, M.A. Use of macrorestriction analysis to demonstrate interhospital spread of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in São Paulo, Brazil. **Clinical Infectious Diseases**. 1996; 23: 631-4.

SHENTAG, J.J.; NIX, D.E.; ADELMAN, M.H. Matemactical examination of individualization principles (1): Relationships between AUC above MIC and area under the inhibitory curve for cefmenoxime, ciprofloxacin and tobramycin. *The Annals Pharmacotherapy*. 1991; 25: 1050-1057.

SOBIESZCZYK, M.E.; FURUYA, E.Y.; HAY, C.M.; PANCHOLI, P.; DELLA-LATTA, P.; HAMMER, S.M.; KUBIN, C.J. combination therapy with Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant Gram-negative respiratory tract infections. **Journal Antimicrobials Chemother**. 2004; 54: 566 – 9.

SCHUREK, K.N.; SAMPAIO, J.L.; KIFFER, C.R.; SINTO, S.; MENDES, C.M.; HANCOCK, R.E. Involvement of pmrAB and phoPQ in polymyxin B adaptation and inducible resistance in non-cystic fibrosis clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal Antimicrobials Chemother**. 2009; 53: 4345-51.

TAM, V.H.; SCHILLING, A.N.; VO, G.; KABBARA, S.; KWA, A.L.; WIEDEHOLD, N.P.; LEWIS, R.E. Pharmacodynamics of Polymyxin B against *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemother**. 2005; 49: 3614-30.

TAM, V.H, CHANG, K.T, ABDELRAOUF, K. Prevalence, resistance mechanisms, and susceptibility of multidrug-resistant bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemother**. 2010; 54(3):1160–4.

TAYLOR, P.J. Method development and optimization of LC-MS in Poletti A. Applications of LC-MS in toxicology. **Pharmaceutical Press**, 2006: 23-42p.

VALERIUS, N.H.; KOCH, C.; HOIBY, N. Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in cystic fibrosis by early treatment. **Lancet Infectious Diseases**. 1991; 338: 725-6.

WENSTEIN, L.; DOAN, T.L.; SMITH, M.A. Neurotoxicity in patients treated with intravenous polymyxin B: two case reports. **American Journal of Health Systems Pharmacists**. 2009; 66: 345-7.

WOODNUT, G. Pharmacodynamic to combat resistance. **Journal Antimicrobials Chemother**. 2000; 46: 25 – 31.

WOLINSKY, E.; HINES, J.D. Neurotoxic and nephrotoxic effects of colistin patients with renal disease. **New England Journal of Medicine**. 1962; 266: 759-62.

YAU, W.; OWEN, R.J.; POUDYAL, A.; BELL, J.M.; TURNIDGE, J.D.; YU, H.H.; NATION, R.L.; LI, J. In vitro pharmacodynamics of colistin against multidrug-resistant *Klebsiella Pneumoniae*. **Journal Antimicrobials Chemother**. 2008; 62: 1311-8.

ZAVASCKI, A.P.; BARTH, A.L.; GONÇALVES, A.L.; MORO, A.L.; FERNANDES, J.F.; MARTINS, A.F.; RAMOS, F.; GOLDANI, L.Z. The influence of metallo-beta-lactamase production on mortality in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Journal Antimicrobials Chemother**. 2006; 58: 387-92.

ZAVASCKI, A.P.; GOLDANI, L.Z.; NATION, R.L. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. **Journal Antimicrobials Chemother**. 2007; 60: 1206 – 15.

ZAVASCKI, A.P.; GOLDANI, L.Z.; CAO, G.; SUPERTI, S.V.; LUTZ, L.; BARTH, A.L.; RAMOS, F.; BONIATTI, M.M.; NATIO, R.L.; LI, J. Pharmacokinetics of intravenous polymyxin B in critically ill patients. **Clinical Infectious Diseases**. 2008; 47: 1298-304.

ZAVASCKI, A.P.; LI, J.; NATION, R.L.; SUPERTI, S.V.; BARTH, A.L.; LUTZ, L.; RAMOS, F.; BONIATTI, M.M.; GOLDANI, L.Z. Stable polymyxin B susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter spp* despite persistent recovery of these organisms from respiratory secretions of patients with ventilator-associated pneumonia treated with this drug. **Journal of Clinical Microbiology**. 2009; 47: 3064-5.

ZAVASCKI, A.P.; CARVALHAES, C.G.; PICÃO, R.C.; GALES, A.C. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. **Expert Review Antimicrobial Infections Therapy**. 2010; 8: 71-93.